

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Genética



TESIS DOCTORAL

**Estudio de la expresión y función de eph-EFN en leucemia
linfática crónica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Eva María Trinidad Álvarez

DIRECTOR:

dir Alonso Colmenar

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5329988221



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

IOLOGIA

T576.32
TRI
est

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Biología

*Leucemia linfocítica aguda-
Tesis ineditas*

***Estudio de la Expresión y Función de
Eph/EFN
en Leucemia Linfática Crónica***

Tesis Doctoral

Eva María Trinidad Álvarez

2011



14052474

A los que me quieren

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Biología

***Estudio de la Expresión y Función de
Eph/EFN
en Leucemia Linfática Crónica***

Dr. Luis Miguel Alonso Colmenar, certifica que **Dña. Eva María Trinidad Álvarez**,
Licenciada en Biología, ha realizado este trabajo bajo su dirección, en el
Centro de Microscopía y Citometría de la Universidad Complutense de Madrid, y
considera que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de
Doctor en Biología.

Vº Bº del DIRECTOR



Fdo.: Luis Miguel Alonso Colmenar

La interesada,



Fdo.: Eva M^a Trinidad Álvarez

Las células están sometidas a una homeostasis permanente, en el momento que este equilibrio se rompe, y la balanza se inclina hacia la vida dejando de lado a la muerte, nos convertimos en víctimas de esta contradicción.

Cuando oímos su nombre, cualquiera de ellos, osteosarcoma, melanoma, linfoma, leucemia, adenocarcinoma de colon, de mama, de pulmón o de próstata, cualquiera, nos hace preguntamos si algún día no caeremos en esa contradicción.

Incluso cuando no está, está. Un cigarrillo, una antena, el oxígeno que respiramos, hasta la luz del Sol ha dejado de ser una agradable caricia para convertirse en una aliada de esta contradicción.

Por ello los múltiples esfuerzos de la comunidad científica para entender cualquiera de sus formas, y he aquí mi pequeña contribución.

---Eva María Trinidad---

Agradecimientos

Parece mentira, mi tesis terminada, pero esto nunca hubiese sido posible si por el camino, en la realización de la misma, no me hubiese encontrado a gente maravillosa, a la que ahora quiero dar las GRACIAS.

A las instituciones y personas que han hecho posible esta tesis:

Ministerio de Ciencia e Innovación, Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III (proyectos FIS PI05/0591; FIS PI08/0093); Servicio de Hematología y Hemoterapia del HGU Gregorio Marañón de Madrid (Drs. José Luis Díez y Mónica Ballesteros y D. Juan Arruga); Servicio de Cirugía del H.C.U. San Carlos de Madrid (Dr. Jaime Zuloaga, Dr. Gonzalo Sanz y Dr. Javier Arias); Centro de Microscopía y Citometría de la UCM (D. Luis Puebla Herranz, ex-director); Centro de Genómica del Parque Científico de Madrid (Campus Moncloa); Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid; a los distintos Servicios de la UCM; y finalmente, de manera especial, a los pacientes por la donación anónima de tejidos para investigación.

A los compañeros y amigos que me ha dado la bio:

A mis compis de la universidad, por las risas, nervios, apuntes, canciones, desvaríos y sueños compartidos, en especial a Jose y a Juani, por eso mismo, por lo especiales que sois.

A Concha Martínez, por darme la primera oportunidad de trabajar en un laboratorio, porque me emocionaba la idea de pensar que con mi pequeña aportación pudiera estar contribuyendo a la ciencia. Tu candidez y buen hacer, me enseñó que esto de investigar puede hacerse con una sonrisa. A tu equipo, Jorge, Aurora, Carmen y Elena, por hacerme sentir parte de él; y a todos los becarios con los que coincidí en aquellos maravillosos años: Jose, Liber, Javi, María, Eva, María y Bea.

A Luis, mi director, porque eres la persona de la que más he aprendido en este periodo, en el más amplio sentido de la palabra, no podía haber tenido mejor maestro. Por haberme transmitido el amor que le tienes a la Ciencia, tu minuciosidad y tu gran capacidad de trabajo. Gracias por el apoyo personal y profesional durante todos estos años, y en especial en estos últimos tiempos, quizá los más duros, por transmitirme que siempre puedo contar contigo.

A Agustín, porque eres fascinante, y no me refiero a tu valía indiscutible como científico, que me impresiona, no lo puedo negar; sino a tu valía como persona. Gracias, porque siempre me has transmitido cariño, el cual yo te también te profeso, haciéndome sentir *siempre* querida y valorada.

A mis compañeros del CAI: a Amalia, por tener siempre una sonrisa con la que iluminas las mañanas; a Alfonso, porque siempre estás dispuesto a echar una mano, gracias por echármela a mí también; a Juanjo, por tu vehemencia; a Carmen, por tu carisma; y a Tere, por aquellos primeros tiempos de carcajadas y locuras, intentando arrancar la sonrisa de los demás. A mis compañeros de medicina, jefes y becarios, por la unión y la fuerza que transmitís. Y a Eva porque eres un solete, por tu ayuda incondicional con la que siempre he podido contar.

Al relevo generacional: a Paula, por la fuerza con la que empiezas, por transmitírmelo, porque a estas alturas en algunos momentos, a mí me flaquean; a Encarna, por enseñarme que se puede cumplir un sueño, dejarlo todo y emprender una nueva vida; a Esther por tu risa contagiosa; a Sara por el optimismo con el que afrontas la vida; a Lucía por tu amor a la ciencia, ¡has nacido para esto!; y a Aida, por la ternura que me transmites, no la pierdas, eh?

Y a todos los que un día pasaron por aquí: Alberto, Miguel, y especialmente a los brasileños, Marco, por impregnar el laboratorio de esa aura tan especial; a Marcele, por su espontaneidad; y ahora Eugenia, por hacerme pensar que todos los brasileños, son personas maravillosas.

A Bea, porque tu periodo aquí fue fundamental, mi “compañera de palizas”, porque salir del laboratorio a las tantas y poder echarme unas risas contigo lo cambiaba todo.

Y sobre todo a mis dos grandes amigos, Javier y David, porque después del grado de Doctor, que espero me sea concedido, lo más valioso que me llevo de este periodo es vuestra AMISTAD.

A los amigos que me ha dado la vida:

A mis amigas, las del cole y las del insti, porque la vida nos ha marcado caminos muy diferentes, pero hemos conseguido mantenernos juntas, gracias por vuestro apoyo durante

todos estos años y por vuestra comprensión, ante los recurrentes: “yo salgo de currar más tarde”, “no, no puedo ir a tomar café”, “no, hoy no puedo salir”. A Nacho, porque eres la mejor “amiga” que se puede tener, por cuidarme, por preocuparte, por animarme, en definitiva, por quererme.

A mis “niños” de confirmación porque completáis esa parte de mi vida que la ciencia no alcanza a explicar.

A mi familia:

A mis sobrinos, Andrés y Almudena, porque transformasteis mi vida, la llenasteis de alegría; y ahora a la pequeña Ainarita, porque me has enseñado a andar de nuevo por ella.

A Charo, mi ejemplo, por representar todo aquello que en lo que me quiero convertir, una madre, una mujer y una cuñada, fabulosa. A Nuria por el ímpetu con el que entiendes la vida. A Juli, por tu capacidad de superación, por enseñarse que nunca es tarde para aprender.

Y a los cuatro pilares de mi vida: mis hermanos y mis padres. A David, porque al ponerme de pequeñita las películas de *Conan* y *Rocky*, me has hecho una luchadora, cualidad indispensable para acabar mi tesis; y porque cuando me enseñabas a esquiar y me obligabas a levantarme tras una caída, me estabas enseñando a algo más que a ponerme en pie. A Miguel Ángel, por las miradas llenas de cariño que me regalas, por iluminar el camino a seguir, por representar la estela que siempre he querido alcanzar, aunque ¿cómo alcanzar la perfección? Y a mis padres, Ángel y Teresa, porque siempre habéis creído en mí, y me habéis animado e impulsado, haciéndome ver que podía llegar donde quisiera, que tan sólo tenía que esforzarme lo suficiente. A mi madre, por estimularme desde muy pequeña, siempre pendiente de mi aprendizaje, a ti te debo mis ganas de aprender; y a mi padre, por tu particular visión de la vida, a ti te debo mi amor por ella.

Y al centro de mi vida: a Mario, mi amor, mi motor. Por apoyarme en este oficio de horarios imposibles, de nervios y estreses. Todo lo vivido ha hecho este amor todavía más grande. Gracias por todos estos años y por todos los que vendrán, toda una vida, como la hipoteca. Gracias porque sigo enamorada de ti, como el primer día, y que sí, que quiero pasar el resto de mis días a tu lado. Ahora es nuestro momento.

A los que no están, porque para mí siempre estarán.

Y a ti lector, que espero que disfrutes de esta tesis, una pequeña parte de lo que he disfrutado, entre otros estados, escribiéndola, y si observas algún fallo, ruego sea perdonado, puesto que *ars longa, vita brevis*.

Índice

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	5
1.- <i>La LLC: clínica, biología y lagunas de conocimiento abordados en el presente trabajo</i>	8
1.1.- <i>Clasificación clínica en la LLC</i>	9
1.2.- <i>Marcadores de carga tumoral</i>	10
1.3.- <i>Receptor de células B (BcR), estado mutacional de IgHV y LLC</i>	11
1.4.- <i>Marcadores subrogados</i>	12
1.5.- <i>Alteraciones genómicas y mutaciones genéticas</i>	13
1.6.- <i>Patobiología de la LLC</i>	14
1.6.1.- <i>LLC y migración</i>	16
1.6.2.- <i>LLC y supervivencia</i>	19
2.- <i>Receptores de membrana tirosina quinasa Eph y ligandos, EFN</i>	21
2.1.- <i>Estructura de Eph y EFN</i>	22
2.2.- <i>Interacción y señalización de Eph/EFN</i>	24
2.3.- <i>Señalización a través de receptores Eph (señal forward) o de ligandos EFN (señal reverse)</i>	26
2.4.- <i>Regulación de la señalización</i>	29
2.5.- <i>Regulación de adhesión celular por Eph/EFN</i>	31
2.6.- <i>Intercomunicación con otras moléculas de membrana</i>	33
2.7.- <i>Eph/EFN en sistema inmune y cáncer</i>	34
OBJETIVOS	37
MATERIAL & MÉTODOS	39
1.- <i>Pacientes</i>	39
2.- <i>Procesamiento de muestras</i>	39
2.1.- <i>Aislamiento de células B, LLC o sanas, a partir de sangre periférica</i>	39
2.1.1.- <i>Aislamiento de células B, LLC o sanas, para extracción de ARN</i>	40
2.1.2.- <i>Aislamiento de células B, LLC o sanas, para ensayos in vitro</i>	42
2.2.- <i>Procesamiento de ganglios linfáticos</i>	43
3.- <i>Cultivos con células endoteliales</i>	44
3.1.- <i>Cultivos de HUVEC</i>	44
3.2.- <i>Cultivos de EA.hy926</i>	44
4.- <i>Análisis de Expresión de Eph/EFN mediante RT-PCR</i>	44
4.1.- <i>Aislamiento de ARN</i>	44
4.2.- <i>RT-PCR</i>	45
4.3.- <i>PCR cuantitativa a tiempo real (Q-RT-PCR)</i>	46
5.- <i>Clonación y secuenciación de productos PCR EFNA4</i>	47
6.- <i>Electroforesis SDS-PAGE y Western Blot</i>	47
7.- <i>Cuantificación de EFNA4 en suero de pacientes mediante ELISA</i>	47
8.- <i>Análisis inmunofenotípicos y de unión de proteínas recombinantes mediante citometría de flujo</i>	48
8.1.- <i>Tinciones con anticuerpos</i>	49
8.2.- <i>Unión de proteínas recombinantes EphA2-Fc y EFNA4-Fc</i>	49

9.- Cultivos celulares	50
9.1.- Cultivos de linfocitos B sanos y estimulación	50
9.2.- Ensayos funcionales y tratamientos Eph/EFN	50
9.2.1.- Proteínas recombinantes Eph/EFN	50
9.2.2.- Ensayos de trans migración en monocapas de HUVEC	52
9.2.3.- Ensayos de adhesión linfocito-endotelio	53
9.2.4.- Ensayos de adhesión de células B a moléculas de matriz extracelular (MEC) o moléculas de adhesión (CAM)	54
9.2.5.- Ensayos de migración en respuesta a gradientes de quimiocinas (quimiotaxis)	55
9.2.6.- Ensayos de supervivencia de células B en presencia de células endoteliales	56
10.- Microscopía Confocal	57
10.1.- Adquisición y análisis de imágenes	57
10.2.- Inmunofluorescencias en ganglios linfáticos	57
10.3.- Ensayos de co-localización y distribución sobre HUVEC	58
10.3.1.- Co-localización de EphA2 y EphA4 con EFNA4-Fc	59
10.3.2.- Distribución topológica de EFNA4-Fc	59
10.3.3.- Distribución de EphA2 respecto a ICAM-1 y VCAM-1 tras el tratamiento con EFNA4-Fc	59
10.3.4.- Distribución de ICAM-1 respecto a EphA2 y VCAM-1 tras el tratamiento con α -ICAM-1	60
10.4.- Interacción linfocitos-endotelio	60
11.- Análisis Estadístico	60
RESULTADOS	63
1.- Caracterización de la expresión de Eph/EFN en B-LLC y B sanas y su posible correlación con la clínica de esta enfermedad	63
1.1.- Análisis comparativo de la expresión de Eph/EFN en células B-LLC y B sanas procedentes de sangre periférica, o tejidos linfoides (linfadenopatías y ganglios linfáticos normales)	63
1.2.- Expresión Eph/EFN de células B-SP en cultivo in vitro bajo diferentes estímulos	67
1.3.- La particular condición de la EFNA4	69
1.4.- Expresión Eph/EFN en relación con las características clínicas de los pacientes de LLC	71
1.5.- Validación de expresión de EFNA4 y EphB6 mediante citometría de flujo	76
1.6.- Caracterización de EFNA4 soluble en plasma de pacientes LLC	78
1.7.- Estudio del patrón de expresión tisular de Eph/EFN en linfadenopatías LLC	80
2.- Papel de la interacción EphA2-EFNA4 en la migración transendotelial (TEM) de B-LLC	83
2.1.- El papel de EFNA4 en la migración transendotelial (TEM) de B-LLC	83
2.2.- Caracterización de células endoteliales y LLC utilizadas en el estudio de TEM	87
2.3.- Parámetros clínicos de los pacientes	89

2.4.-	<i>La Migración Trans-Endotelial (TEM) de las células B-LLC a través de la monocapa de HUVEC está mediada por la interacción EphA2-EFNA4</i>	90
2.5.-	<i>La adhesión de células B-LLC a HUVEC es significativamente menor que la de Bs sanos, lo cual está directamente relacionado con la expresión de EFNA4</i>	94
2.6.-	<i>Papel autónomo de EFNA4 en la adhesión de células B-LLC a endotelio</i>	97
2.7.-	<i>EphA2-Fc inhibe la migración mediada por CCL19 de células B-LLC-SP</i>	101
2.8.-	<i>EphA2 parece regular la adhesión a endotelio a través de ICAM-1 y VCAM-1</i>	103
3.-	<i>Estudio del posible papel de EFNA4 en la supervivencia de B-LLC mediada por endotelios</i>	106
3.1.-	<i>Las muestras B-LLC-SP muestran diferentes capacidades de supervivencia in vitro</i>	106
3.2.-	<i>Estudio de la supervivencia de células B-LLC en co-cultivo con endotelio</i>	108
3.3.-	<i>Papel de la interacción EphA2-EFNA4 en la apoptosis de B-LLC co-cultivadas con HUVEC</i>	113
3.4.-	<i>Papel de ICAM-1, VCAM-1 y EphA2 en la apoptosis de B-LLC mediada por contactos con endotelio</i>	116
	DISCUSIÓN	123
	<i>Patrón de expresión de Eph/EFN en células B-LLC y en células B sanos</i>	124
	<i>Papel de la interacción EphA2-EFNA4 en la diapédesis linfocitaria</i>	132
	<i>Las células B-LLC presentan una capacidad de migración transendotelial parcialmente disminuida ligada al papel autónomo de la sobreexpresión de EFNA4</i>	132
	<i>Papel de EphA2 en la diapédesis linfocitaria</i>	140
	<i>Papel de EFNA4 en la supervivencia de B-LLC</i>	143
	<i>Perspectivas futuras</i>	149
	CONCLUSIONES	151
	BIBLIOGRAFÍA	153
	ANEXOS	169
	<i>Anexo I</i>	169
	<i>Anexos II-IV</i>	171
	<i>Anexo V</i>	181
	<i>Anexo VI</i>	183
	<i>Anexo VII</i>	195
	<i>Información Suplementaria Anexo VII</i>	205
	<i>Anexo VIII</i>	211

Abreviaturas

A lo largo de esta tesis doctoral se han utilizado las siguientes abreviaturas:

7-AAD	7-AminoActinomicina D	B-LLC	Células B de Leucemia Linfática Crónica
α	Subunidad α de una proteína	BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> , albúmina bovina
α-	Prefijo anti-, de anticuerpo	CAM	<i>Cell Adhesion Molecules</i> , moléculas de adhesión celular
aa	Aminoácido	CCR	Receptor de quimiocinas CC
ADN	Ácido DesoxirriboNucleico	CD	<i>Cluster of Differentiation</i> , grupo de diferenciación
ADNc	ADN complementario	CL-I	Colágeno-I
Ag/Ags	Antígeno/ Antígenos	CXCR	Receptor de quimiocinas CXC
AH	Ácido hialurónico	E-	Célula Endotelial
APC	Alophicocianin, aloficocianina	EDTA	<i>EthyleneDiamineTetraacetic Acid</i> , ácido etilen-diamino-tetra-acético.
ARN	Ácido RiboNucleico	EFN	<i>Ephrin- Eph receptor interacting protein</i> , efrina
ARNm	ARN mensajero	Eph	<i>Erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma</i> , Eritropoietina producida por carcinoma hepatocelular
B	Célula B	FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> , clasificador celular por fluorescencia
-b	Biotina	FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , suero de ternero fetal
BcR	Receptor de las células B	FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> , isotiocianato de fluoresceína

FN	Fibronectina	LDH	Lactato DesHidrogenasa
HEV	<i>Human Endothelial Venules</i> , vénulas endoteliales humanas	LM	Laminina
g-	Campo gravitatorio	MACS	<i>Magnetic-Activated Cell Sorting</i> , clasificador celular por magnetismo
g	Gramos	MEC	Matriz ExtraCelular
GL	Ganglio Linfático	MO	Médula Ósea
h-	Procedencia humana	pb	Pares de bases
Hb	Hemoglobina	PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , solución salina tamponada con fosfatos
h-Fc	Fragmentos humanos Fc	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa
Hist-	Histidina	PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i> , células endoteliales de vena procedentes de cordón umbilical humano	PE	Phicoeritrin, ficoeritrina
ICAM-1	<i>Inter-Cell Ahesion Molecule-1</i> , molécula de adhesión intercelular-1	PE-Cy5	Phicoeritrin Ficoeritrina
Ig/Igs	Inmunoglobulina/ Inmunoglobulinas	Q-RT-PCR	<i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> , reacción reversa en cadena de la polimerasa a tiempo real
IMF	Intensidad media de fluorescencia	rh	Recombinante humana
LLA	Leucemia Linfática Aguda	rpm	Revoluciones por minuto
LLC	Leucemia Linfática Crónica	RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> , reacción reversa en cadena de la polimerasa

SAV	<i>Streptavidin</i> , estreptoavidina	TNF-α	<i>Tumor necrosis factor-α</i> , factor de necrosis tumoral- α
SLPC	Síndromes Linfoproliferativos Crónicos	VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i> , molécula de adhesión vascular-1
SP	Sangre Periférica	VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> , factor de crecimiento vascular endotelial
TAE	Tris-acetato EDTA	VN	Vitronectina
TcR	Receptor de las células T	X⁻	Negativo para el marcador empleado
TEM	<i>Trans endothelial migration</i> , migración trans-endotelial	X⁺	Positivo para el marcador empleado

Introducción

Los Síndromes Linfoproliferativos Crónicos (SLPC) de células B constituyen un subgrupo de neoplasias linfoides caracterizadas por la acumulación ralentizada de una población clonal, presumiblemente originada en algún estadio madurativo del linaje B. Las neoplasias más frecuentes que se engloban dentro de estos SPLC son: Leucemia Linfática Crónica (LLC), Linfoma de Células del Manto (LCM), Linfoma Folicular (LF), Linfoma De Células Grandes (LDCG), Linfoma de la Zona Marginal (LZM), Linfoma Esplénico de la Zona Marginal (LEZM), TriCoLeucemia o leucemia de células vellosas (TCL), Linfoma Linfo-Plasmacitoide (LLP) y Mieloma Múltiple (MM) (*Tabla 1*). En general, presentan características fenotípicas y biológicas semejantes a las de las subpoblaciones B de las que, en principio, se originan y por ello representan un potencial material de estudio, del que podrían inferirse, directa o indirectamente, nuevos conocimientos acerca de aspectos diversos de la biología del linfocito B, no del todo claros o incluso desconocidos, incluyendo la descripción de nuevos mecanismos moleculares y/o aspectos celulares (*Staudt y Dave, 2005*). Por tanto, desde un punto de vista estrictamente científico, podríamos decir que estos SPLC representan “modelos experimentales naturales” cuyo estudio podría contribuir al avance del conocimiento de la biología del linfocito B, como de hecho ha ocurrido con otras patologías.

Desde esta perspectiva, la Leucemia Linfática Crónica (LLC), en comparación con otros SLPC, presenta ciertas características clínicas y moleculares únicas, lo que podría resultar especialmente útil para profundizar en la biología del linfocito B maduro. Además, desde el punto de vista de la propia enfermedad, existen numerosas “lagunas” cuyo esclarecimiento es necesario de cara a su prevención, diagnóstico precoz, pronóstico y tratamiento, como se detalla más adelante. Así, dentro de los SLPC, la LLC destaca por ser la de mayor heterogeneidad en su presentación clínica y evolución, pudiendo manifestarse tanto una forma agresiva, con necesidad de tratamiento y con esperanza de vida corta, como una forma asintomática, sin necesidad de tratamiento y con una mayor esperanza de vida, habiéndose sugerido la posibilidad de que se tratara de dos enfermedades distintas (*Hamblin, 2002; D'Arena y cols., 2003*). De hecho, en la mayoría de los casos el tratamiento no se inicia tras el diagnóstico de la enfermedad, sino que el especialista clínico se mantiene en actitud de “espera y seguimiento” hasta constatar un agravamiento clínico asociado a la enfermedad. Actualmente no existen indicadores o marcadores para el diagnóstico precoz de la LLC y escasos o poco útiles los de pronóstico, como se detalla más adelante, por lo que es necesario encontrar nuevos o complementarios a los que ya hay (*Zenz y cols., 2010a*).

Una característica diferencial de la LLC en relación a otros SLPC, es su potencial capacidad de diseminación a un amplio espectro de tejidos, principalmente linfoides, así como su acumulación en la sangre periférica de todos los pacientes (*Bertilaccio y cols., 2010*). Clásicamente, las células B-LLC han sido estudiadas como células con una alta capacidad de invasión tisular (*Ghia y Caligaris-Cappio, 2000; Hamblin, 2002; D'Arena y cols., 2003; Keating y cols., 2003; Ghia y Caligaris-Cappio, 2006; Ghia y cols., 2008*). Sin embargo, a pesar de esta supuesta alta capacidad invasiva y su gradual acumulación pausada en la sangre periférica de todos los pacientes, ésta no siempre va acompañada de su diseminación, sugiriendo que sólo en determinadas circunstancias las B-LLC podrían infiltrar los órganos. Por razones totalmente desconocidas hasta la fecha, la enfermedad puede mantenerse estable durante mucho tiempo o progresar, tanto desde un punto de vista espacial, con la colonización de nuevos territorios (diseminación), como temporal, comenzando un nuevo ritmo de evolución, ambos actualmente impredecibles. En este sentido, la capacidad de migración de estas células ha sido materia de intenso estudio durante años, dado que la colonización de compartimentos tisulares podría contribuir al agravamiento de la enfermedad (*Ghia y Caligaris-Cappio, 2000; Hamblin, 2002; D'Arena y cols., 2003; Keating y cols., 2003; Munk Pedersen y Reed, 2004; Ghia y Caligaris-Cappio, 2006; Ghia y cols., 2008*). Así, mientras que la infiltración de médula ósea se da en todos los pacientes, otros tejidos como ganglios linfáticos, bazo o hígado, pueden infiltrarse o no sugiriendo la existencia de factores y/o mecanismos moleculares aún desconocidos que podrían mediar en este proceso (*Ghia y Caligaris-Cappio, 2000; Hamblin, 2002; D'Arena y cols., 2003; Keating y cols., 2003; Ghia y Caligaris-Cappio, 2006; Ghia y cols., 2008*). En los tejidos linfoides infiltrados por las B-LLC, éstas se organizan en estructuras denominadas centros proliferativos o pseudofolículos, que representan focos de proliferación y supervivencia de las células leucémicas (*Ghia y Caligaris-Cappio, 2000; Hamblin, 2002; D'Arena y cols., 2003; Keating y cols., 2003; Munk Pedersen y Reed, 2004; Ghia y Caligaris-Cappio, 2006; Ghia y cols., 2008*) y, donde presumiblemente, se salvaguardan de las terapias (*Munk Pedersen y Reed, 2004; O'Brien y Kay, 2011*). Otra consecuencia de la infiltración de tejidos es que altera la normal fisiología del órgano lo que, en el caso de tejidos linfoides, podría contribuir a las alteraciones inmunológicas y hematológicas observadas en algunos pacientes como inmunodeficiencias, procesos autoinmunes, anemia y/o trombocitopenia (*Ghia y Caligaris-Cappio, 2000; Hamblin, 2002; D'Arena y cols., 2003; Keating y cols., 2003; Ghia y Caligaris-Cappio, 2006; Ghia y cols., 2008*). Por tanto, parece clave ahondar en los

mecanismos de migración de las B-LLC dado que terapias dirigidas a bloquearlos podrían, potencialmente, evitar su diseminación.

Otro aspecto del mayor interés en la LLC es el de que su aparente resistencia a apoptosis *in vivo* (revisado en *Caligaris-Cappio, 2000*) no se traslada a la condición *in vitro* (*Collins y cols., 1989; McConkey y cols., 1991*), sugiriendo que determinados factores solubles (*Jablonska y cols., 2005; Hock y cols., 2006; Molica y cols., 2006*) y seguramente otros aún no identificados en el suero, o el contacto con ciertas poblaciones celulares (*Panayiotidis y cols., 1996; Lagneaux y cols., 1998; Pedersen y cols., 2002; Tsukada y cols., 2002; Plander y cols., 2009*), incluidos los propios endotelios (*Buggins y cols., 2010*), podrían contribuir a su supervivencia *in vivo*. Sin embargo, a fecha de hoy, no existe una explicación definitiva a este fenómeno, por lo que continúa siendo materia de intenso debate, como detallaremos más adelante.

Parecía clara, por tanto, la necesidad de nuevos y/o mejores marcadores de pronóstico de cara a la enfermedad, complementarios o añadidos a los ya existentes, así como el estudio de nuevos mecanismos moleculares que expliquen la patobiología de la enfermedad. En este sentido, la familia de receptores tirosina quinasa Eph y ephrin (EFN), se postulaban como posibles candidatos por su presencia en sistema inmune y su papel creciente en cáncer (*Pasquale, 2005; Wimmer-Kleikamp y Lackmann, 2005; Chen y cols., 2008; Janes y cols., 2008; Pasquale, 2008*). Esta familia de moléculas participa en mecanismos de atracción/repulsión celular, a través de la regulación del citoesqueleto y otras moléculas de adhesión, y también está implicada en quimiotaxis, afectando, directa o indirectamente, a multitud de procesos celulares en los que el posicionamiento celular es clave como durante la morfogénesis (revisado en *Watanabe y Takahashi, 2010*), la determinación del patrón axónico o de la vascularización (revisado en *Feldheim y O'Leary, 2010*), la angiogénesis (revisado en *Hiratsuka, 2011*) y también en otros ámbitos celulares, quizá menos conocidos, como la supervivencia, la proliferación y la fisiología tisular (revisado en *Friedman y O'Leary, 1996*).

1.- La LLC: clínica, patobiología y lagunas de conocimiento abordados en el presente trabajo

La LLC es el SLPC más frecuente en la población occidental, representando más del 30% de todas las leucemias, con una incidencia de 1,5 casos por cada 100.000 habitantes al año. Su manifestación clínica está muy asociada a la edad, con una mediana superior a los 60 años, aunque su diagnóstico en individuos de menor edad es cada vez más frecuente (Moreno y Montserrat, 2008). Habitualmente, el diagnóstico comienza tras la observación de una linfocitosis superior a $5 \times 10^9/L$ en sangre periférica de forma mantenida y se confirma mediante citometría de flujo, en base a los criterios fenotípicos mostrados en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Características Fenotípicas de los Síndromes Linfoproliferativos Crónicos.

Enfermedad Marcadores	LLC	LCM	LF	LDCG	LZM	LEZM	TCL	LLP	MM
CD19	+	+	+	+	+	+	+	+	-/+
CD20	débil	+	+	+	+	+	+	+	-
CD22	débil	+	+	+	+	+/++	++	+	-
FMC7	-/débil	+	+	+	+	+	+	+	-
CD5	+	+	-/+	-/+	-	-/+	-	-/+	-
CD23	+	-	-/+	-/+	-	-/+	-	-/+	-
CD10	-	-	+/-	-/+	-	-	-	-	-

Leyenda: ++ 100% positivas; + >90% positivas; - > 90% negativas; -/+ con mayor frecuencia las células son negativas; +/- con mayor frecuencia las células son positivas. **LCM:** Linfoma de células del manto; **LF:** Linfoma Folicular; **LDCG:** Linfoma De Células Grandes; **LZM:** Linfomas de la zona marginal; **LEZM:** Linfoma Esplénico de la Zona Marginal; **TCL:** Tricoleucemia o leucemia de células vellosas; **LLP:** Linfoma Linfo-Plasmacitoide; **MM:** Mieloma Múltiple.

Las células B-LLC periféricas presentan fenotipo de linfocito B maduros (*Tabla 1*), caracterizados por una fuerte positividad para CD19 (*Anexo I*) y débilmente de CD20 y CD22 (*Anexo I*), mientras que FMC7 (epítipo de CD20) (*Deans y Polyak, 2008*) puede estar ausente o expresado débilmente. De forma característica, las células B-LLC sobreexpresan el antígeno CD5 (*Anexo I*), un marcador habitualmente ausente en la población B sana y que permite su diagnóstico diferencial y el de LCM frente a otros tipos de SLPC tipo B (*Tabla 1*). Es también característica la expresión de CD23 (*Anexo I*) en LLC, permitiendo la diferenciación fenotípica con LCM, además de los marcadores CD20, CD22 y FMC7, que el caso de la LCM muestran fuerte expresión. Las B-LLC no expresan el antígeno CD10 (*Anexo I*), lo que permite

distinguirla de otros SLPC tipo B, que en ocasiones son CD5⁺, como algunos casos de LF o de LDCG.

Los factores pronóstico utilizados en la LLC son el estadio de la enfermedad (*Rai y cols., 1975; Binet y cols., 1981*), ciertos marcadores de carga tumoral, como timidina quinasa (TK, *Thymidine Kinase*) y β 2-microglobulina (β 2-MG), la expresión de ciertas proteínas, como CD38 (*Anexo I*) y ZAP70, y parámetros genéticos, incluido el estado mutacional de IgVH (segmento variable de los genes de la cadena pesada de inmunoglobulinas), las alteraciones genómicas y las mutaciones de genes individuales (*Hallek y cols., 1999; Oscier y cols., 2002; Moreno y Montserrat, 2008; Wierda y cols., 2009; Zenz y cols., 2010b*).

1.1.- Clasificación clínica en la LLC.

Clásicamente se han utilizado dos criterios de clasificación clínica originalmente establecidos por Rai o Binet (*Rai y cols., 1975; Binet y cols., 1981*), basados en la sintomatología presentada por los pacientes (*Tabla 2 y 3*).

Tabla 2. Criterio de Clasificación según Rai para LLC.

Rai	Linfocitosis	Linfoadenopatía	Esplenomegalia/ Hepatomegalia	Anemia	Trombocitopenia
Estadio 0	>15.000 mm ³	No	No	No	No
Estadio 1	>15.000 mm ³	Sí	No	No	No
Estadio 2	>15.000 mm ³	Sí o No	Sí	No	No
Estadio 3	>15.000 mm ³	Sí o No	Sí o No	Sí, Hb <11 g/dL	No
Estadio 4	>15.000 mm ³	Sí o No	Sí o No	Sí o No	Sí <100.000mm ³

Tabla 3. Criterio de Clasificación según Binet para LLC.

Binet	Linfocitosis	Anemia o Trombocitopenia	Áreas linfoides afectadas	Correspondencia con Clasificación Rai
A	>15.000 mm ³	No	Menos de 3	Estadio 0, I y II
B	>15.000 mm ³	No	Igual o Más de 3	Estadio I y II
C	>15.000 mm ³	Sí	Independiente	Estadio III y IV

* [Nota: las áreas linfoides incluyen los ganglios linfáticos cervical, axilar, inguinal y bazo]

En ambas clasificaciones, la anemia y la trombocitopenia son las principales variables de pronóstico adverso. La presencia de linfadenopatías (engrosamiento >1.00 cm) y su número representa una condición clínica adversa no del todo relacionada con un peor pronóstico. La clasificación Binet considera el número de áreas linfoides afectadas y la insuficiencia de médula ósea; su beneficio principal deriva del reconocimiento de una forma predominantemente esplénica de la enfermedad, la cual puede tener un mejor pronóstico que en la clasificación Rai, y del reconocimiento que la presencia de anemia o trombocitopenia tiene un pronóstico similar y no merece un estadio separado. Ninguno de los sistemas separa las causas inmunes de las causas no inmunes en relación a la citopenia. Pacientes con trombocitopenia o anemia, o ambos, como resultado de infiltración masiva de la médula ósea y producción celular alterada (Rai III/IV, Binet C) tienen un peor pronóstico que los pacientes con citopenias inmunes. El *International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia* ha recomendado la integración de la clasificación Rai y Binet de la siguiente manera: A(0), A(I), A(II); B(I), B(II); y C(III), C(IV) (Zwiebel y Cheson, 1998). Posteriormente, la clasificación Rai fue modificada en estadios de riesgo de la siguiente manera (Rai y Han, 1990): riesgo bajo (Rai 0), riesgo intermedio (Rai 1-2) y riesgo alto (Rai 3-4) y será la utilizada en esta tesis.

1.2.- Marcadores de carga tumoral

La carga tumoral y otros parámetros de actividad de la enfermedad han mostrado su importancia como factores pronóstico en LLC tales como el recuento leucocitario en sangre periférica, su tiempo de duplicación, los niveles séricos de Lactato DesHidrogenasa (LDH) o el patrón de infiltración celular en Médula Ósea (MO) (revisado en Seiler y cols., 2006). Los niveles elevados de LDH y el alto número de linfocitos se asocian con la actividad de la enfermedad. Aunque correlaciona con el estadio clínico, el tiempo de duplicación de linfocitos se demostró que podía tener un significado pronóstico en sí mismo: tiempo de duplicación de linfocitos de 12 meses o inferior identifica a una población de pacientes con mal pronóstico (Montserrat y cols., 1986). La infiltración de MO por linfocitos ha sido considerada en relación a su impacto en el pronóstico. Varios estudios mostraron que los casos con infiltración difusa de MO presentaban un peor pronóstico en comparación con los casos que presentaban un patrón nodular (Rozman y cols., 1984). Los análisis más recientes sugieren, sin embargo, que el patrón de infiltración de MO sólo, no puede ser tomado como

un factor pronóstico independiente, sino considerando otros marcadores genéticos importantes (Zenz y cols., 2010a). Una serie de parámetros serológicos, tales como TK y β 2-MG pueden ser útiles en relación con la actividad de la enfermedad (Kantarjian y cols., 1992; Hallek y cols., 1999; Wierda y cols., 2009). Los niveles de TK se correlacionan con la actividad proliferativa de las células B-LLC, de forma que niveles elevados podrían predecir la progresión de la enfermedad. Niveles séricos de β 2-MG, una proteína extracelular asociada con las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, *Mayor Histocompatibility Complex*), correlacionan también con el estadio clínico de los pacientes.

En ningún caso, sin embargo, los marcadores mencionados hasta aquí pueden ser utilizados de forma aislada, ni resultan determinantes en el pronóstico, sino que, más bien, son utilizados en la práctica clínica como indicadores para el inicio de tratamiento.

1.3.- Receptor de células B (BcR), estado mutacional de IgVH y LLC

Las respuestas de células B al antígeno están mediadas por su receptor antigénico (BcR, *B cell Receptor*), presente en las células B, normales y malignas. Las células B portan distintos BcR basados en la combinación de segmentos de genes variables V, D, J (cadena pesada) y V, J (cadena ligera) (Klein y Dalla-Favera, 2008). El repertorio posible de BcR aumenta exponencialmente por la introducción de hipermutaciones somáticas que acontecen en los centros germinales (Klein y Dalla-Favera, 2008). En 1999, se relacionó el pronóstico de la enfermedad con la mutación de los genes V_H de Ig (IgV_H), convirtiéndose éste en el marcador de pronóstico más predictivo (Hamblin y cols., 1999). Atendiendo al grado de hipermutación somática de IgV_H, la LLC puede ser clasificada como mutada (mejor pronóstico) o no mutada (peor pronóstico) (Fais y cols., 1998; Damle y cols., 1999; Hamblin y cols., 1999). Esta discriminación entre mutadas y no mutadas, se basa en identidades de secuencia nucleotídica en relación a la germinal, habiéndose encontrado que un valor de corte del 98% de homología con la secuencia germinal discrimina grupos de pacientes que presentan un curso clínico extremadamente diferente (Fais y cols., 1998; Damle y cols., 1999; Hamblin y cols., 1999; Krober y cols., 2002). Los pacientes que presentan B-LLC con IgV_H no mutada siguen una evolución desfavorable, con rápida progresión y muerte prematura, mientras que los pacientes que presentan B-LLC con IgV_H mutado a menudo muestran progresión lenta y larga supervivencia. Por tanto, el estado de mutación de IgV_H es clínicamente relevante, ya

que predice el riesgo de progresión de la enfermedad en pacientes de LLC (*Damle y cols., 1999; Hamblin y cols., 1999; Krober y cols., 2002*).

1.4.- Marcadores subrogados

No obstante, la determinación de la condición de mutación IgV_H, no se usa normalmente en la práctica clínica, por lo que se buscan "marcadores indirectos" (subrogados) que estén estrechamente correlacionados con el estado de mutación IgV_H y que sean de más fácil determinación en la práctica. El más ampliamente utilizado en la actualidad es la expresión de ZAP-70 (*Zeta-Associated Protein of 70 kDa*), identificado en estudios de perfiles de expresión génica en algunos pacientes LLC (revisado en *Zenz y cols., 2010a*). ZAP-70 es una molécula involucrada en la señalización del receptor antigénico de células T. Uno de los primeros estudios al respecto (*Crespo y cols., 2003*), señalaba que los niveles de ZAP-70 determinados mediante citometría de flujo, separan distintos grupos-pronóstico de pacientes LLC Binet A con un comportamiento clínico similar. Los pacientes que mostraron al menos un 20% de células positivas para ZAP-70, no presentaban mutación de IgV_H; mientras que los que mostraron un porcentaje de expresión menor o nulo de esta proteína, presentaban mutaciones de IgV_H. Esta capacidad predictiva de ZAP-70 ha sido confirmada después en numerosos estudios (*Orchard y cols., 2004; Rassenti y cols., 2004; Krober y cols., 2006*).

Cualquier nuevo marcador de pronóstico debe relacionarse con los marcadores ya conocidos para, de este modo, poder definir su dependencia o independencia de otros marcadores. Varios estudios han demostrado una fuerte asociación entre alta expresión de ZAP-70, ausencia de mutación IgV_H y función del BcR (*Rassenti y cols., 2004; Krober y cols., 2006; Rassenti y cols., 2008*); no obstante, se han observado casos discordantes entre la expresión de ZAP-70 y el estado de mutación de IgV_H, coincidiendo estas discordancias con la presencia de alteraciones génicas de alto riesgo (*Krober y cols., 2006*). En ausencia de estas alteraciones genómicas de alto riesgo, el estado de IgV_H y ZAP-70 puede ser aplicado alternativamente. Un problema sobre la determinación de ZAP-70 en la práctica clínica lo constituye la estandarización de un ensayo de citometría para su medición; como alternativas, se sugieren otros métodos, como la determinación de la metilación de ZAP-70 o

la cuantificación de los niveles de sus transcritos, ARNm, cuya estandarización es más sencilla (Corcoran y cols., 2005).

Otro marcador cuya determinación fenotípica resulta sencilla es la expresión de CD38 medida por citometría de flujo. Una baja expresión de este antígeno se asoció con la presencia de mutaciones IgV_H (Damle y cols., 1999), aunque estudios posteriores confirmaron que este marcador no tenía tanta capacidad predictiva como el estado mutacional de IgV_H (Ibrahim y cols., 2001).

1.5.- Alteraciones genómicas y mutaciones genéticas

Aproximadamente un 80% de casos LLC presentan alteraciones en unas pocas regiones cromosómicas de forma recurrente (Dohner y cols., 2000; Zenz y cols., 2010b) (Tabla 4). Los grupos de LLC con IgV_H, tanto mutado como sin mutación, comparten alteraciones genómicas pero la incidencia de las aberraciones de alto riesgo (deleciones 11q ó 17p) es mayor en las formas de la enfermedad con IgV_H no mutada. A pesar de que en el momento del diagnóstico clínico raramente se detectan anomalías cariotípicas, al igual que ocurre con otras neoplasias, a lo largo del tiempo y como consecuencia del descontrolado aumento de los ciclos de división éstas suelen aparecer, habiéndose observado tanto pérdidas (monoalélicas y bialélicas) como ganancias (duplicaciones, amplificaciones y trisomías). Las anomalías más frecuentes son las deleciones 13q14, 11q22-q23, 17p13 y 6q21 junto con la trisomía 12q13 (Stilgenbauer y cols., 2002).

Tabla 4. Impacto clínico de la aberraciones genómicas en LLC

Aberración	Incidencia	Supervivencia Libre de Progresión (meses)	Supervivencia Global (meses)
No aberración	25%	70,6	No alcanzado
del 13q14	36%	62,3	80,8
del 11q23	21%	43,8	73,7
+12	14%	41,9	No alcanzado
del 17p13	5%	19,2	19,2
t 14q32	5,6%	21,8	No alcanzado

Esta tabla se corresponde al ensayo CLL4 alemán, revisado en Zenz y cols., 2010^a.

Leyenda: del: deleción; +: trisomía; t: translocación.

Aunque para algunas de estas deleciones se desconoce su consecuencia, para otras de ellas sí es conocida, como que la deleción (del)11q22-23 implica la ausencia de ATM (*Ataxia Telangiectaria Mutated*) y la del17p13 implica la de p53. Una consecuencia dramática de estas anomalías cariotípicas es que pueden conducir a variantes más peligrosas de la enfermedad más difíciles de tratar (*Keating y cols., 2003*).

1.6.- Patobiología de la LLC

La etiología de la LLC, a diferencia de la del resto de leucemias tipo B, hoy por hoy no parece estar relacionada con alteraciones genéticas como consecuencia de radiaciones, agentes químicos o citostáticos, transformaciones virales o como consecuencia de mutaciones originadas en procesos de recombinación somática como los que tienen lugar en distintos momentos de la biología del linfocito B. Aunque se considera una enfermedad adquirida, recientemente se han aportado nuevos datos que reflejan una mayor incidencia de LLC en determinadas familias (*Rawstron y cols., 2002*), lo que parece indicar que se pueda heredar la susceptibilidad a desarrollarla. En un porcentaje relativamente alto de pacientes y en un porcentaje variable de células B-LLC, se detectan alteraciones citogenéticas (*Tabla 4*), cuya presencia podría estar relacionada con la maduración o envejecimiento de la enfermedad y, en algunos casos, su agravamiento pero no ha podido determinarse hasta la fecha como origen mismo de ella.

En este sentido, los datos actuales apuntan a que las células leucémicas de ambos grupos de pacientes LLC tienen una procedencia común, a partir de linfocitos maduros que han tenido una experiencia antigénica y que son inmunológicamente competentes. Así, basándose en mediciones de longitud de telómeros (*Hultdin y cols., 2003; Keating y cols., 2003; Damle y cols., 2004*) y estudios *in vivo*, en pacientes a los que se les suministra agua deuterada (*Hellerstein y Neese, 1999; Messmer y cols., 2005*), se ha propuesto que la LLC no es un proceso pasivo de acumulación de células resistentes a muerte, como se apuntaba tradicionalmente (*Dameshek, 1967*), sino un proceso dinámico de proliferación/muerte (*Keating y cols., 2003*).

La enfermedad por tanto, podría tener su origen en un componente antigénico aún por determinar, presumiblemente asociado a infecciones, virales o bacterianas (*Chiorazzi y cols., 2005; Rosen y cols., 2010*), que podría servir de condicionante en su posterior desarrollo, comúnmente en individuos de edad avanzada (>60 años) por lo que podría existir cierto grado de asociación con el envejecimiento del sistema inmune. La presencia de BcR estereotipados, uso preferencial de ciertos segmentos VDJ y similitud de CDR3 (tercera región determinante de la complementariedad, *Complementarity Determining Region*), en muestras LLC de pacientes no emparentados, así como la presencia de BcR autoreactivos (*Herve y cols., 2005; Buhler y cols., 2010*), apoyan aún más la teoría de una “respuesta inmune” antígeno específica en el origen de la LLC (*Ghia y Caligaris-Cappio, 2006; Tobin y cols., 2006; Binder y cols., 2010*). Recientemente, se ha descrito la presencia en un bajo porcentaje de individuos adultos de una linfocitosis monoclonal B de características semejantes a B-LLC (*Nieto y cols., 2009; Shim y cols., 2010; Almeida y cols., 2011*), que podría tener relación con el posterior desarrollo de esta enfermedad bajo ciertos condicionantes aún desconocidos, como la edad o las infecciones anteriormente señaladas.

Por otra parte, es importante remarcar la importancia de los microambientes donde se desarrollan y sobreviven las B-LLC en la patogenia de la enfermedad. Si bien se desconoce en gran medida la naturaleza celular y molecular de estos microambientes, especialmente en el origen de la enfermedad, podrían estar relacionados con los denominados centros linfoproliferativos o pseudofolículos que aparecen en médula ósea y ganglios linfáticos. Tales centros están enriquecidos en células B-LLC en división, parecen jugar un papel clave en la supervivencia de la enfermedad (*Munk Pedersen y Reed, 2004*) y, presumiblemente, en su “diferenciación” (*Patten y cols., 2008*). Por ejemplo, podrían contribuir a la generación de las alteraciones cromosómicas que acabamos de detallar, algunas de ellas muy frecuentes pero con distinto grado de repercusión (*Klein y Dalla-Favera, 2010*), y otras denominadas “raras” por su baja frecuencia, pero que en conjunto contribuyen a la heterogeneidad de esta enfermedad. Alternativamente, los microambientes podrían jugar un papel clave en la resistencia a tratamiento, la aparición de recidivas o, incluso, la transformación de la LLC en variantes más agresivas como LDCBG (Linfoma Difuso de Células B Grandes) o la llamada transformación de Richter (*Fangazio y cols., 2011*). El supuesto defecto en apoptosis indicado como causa de la acumulación pasiva de estos linfocitos B en sangre periférica (*Dameshek, 1967; Dighiero y cols., 1991; Caligaris-Cappio, 2000*), fue cuestionado por estudios *in vitro* en

los que este defecto no se encontró (Collins y cols., 1989; McConkey y cols., 1991), señalándose nuevamente al microambiente como el responsable de proporcionar señales de supervivencia al linfocito B leucémico (Ghia y Caligaris-Cappio, 2000; Munk Pedersen y Reed, 2004). A este respecto, se han señalado numerosos tipos celulares capaces de suministrar estas señales de supervivencia al linfocito B-LLC: células T (Plander y cols., 2009), células dendríticas (Pedersen y cols., 2002), NLC (NurseLike Cells) (Tsukada y cols., 2002), células estromales de médula ósea (Panayiotidis y cols., 1996; Lagneaux y cols., 1998) y células endoteliales (Long y cols., 1995; Moreno y cols., 2001; Zucchetto y cols., 2009; Buggins y cols., 2010). En este contexto, las señales bi-direccionales entre los linfocitos leucémicos y las células no transformadas podrían permitir el establecimiento de un microambiente anormal, siendo este capaz de inhibir la apoptosis de la células B neoplásicas y/o salvaguardando a éstas de los tratamientos citotóxicos (Munk Pedersen y Reed, 2004). Algunas de estas células ejercen su acción protectora mediante la expresión de quimiocinas y citocinas, como las NLC y las células estromales de médula, que expresan altos niveles de SDF-1 α (Stromal cell Derived Factor-1 α , también denominada CXCL12) (Burger y cols., 2000). Una posible explicación sería que las células B-LLC recirculan desde la sangre a través de los tejidos linfoides secundarios y vuelven a la circulación en respuesta a quimiocinas como SDF-1 α , CXCL13, CCL21 y/o CCL19 (Burger y Kipps, 2002), de manera que esta atracción facilita que las células leucémicas vuelvan a recibir estímulos de supervivencia por parte de estas células y de otros elementos estromales, si bien esta hipótesis no ha sido definitivamente aceptada.

Todas estas evidencias ponen de manifiesto la importancia del estudio de la migración de las B-LLC a tejidos por su papel determinante en la patobiología de la enfermedad.

1.6.1.- LLC y migración

La linfocitosis, una seña de identidad de la LLC, no siempre va acompañada de números elevados de estas células leucémicas en los tejidos linfoides secundarios, algo que cabría esperar si estas células presentaran una capacidad de recirculación normal como la de B sanas, sugiriendo, por tanto, que las B-LLC podrían tener alterados los mecanismos normales de recirculación. De hecho, en ausencia de linfadenopatías patentes, las células B-LLC están ausentes o en un número muy bajo en los tejidos linfoides examinados (Hamblin,

2002; Moreno y Montserrat, 2008). De acuerdo con esta hipótesis, distintas evidencias tanto *in vivo* (Bazerbashi y cols., 1978; Dormer y cols., 1983) como *in vitro* (Chen y cols., 1999), indicaban indirectamente que las células B-LLC migraban escasamente a los tejidos linfoides.

En la condición normal, el tráfico de linfocitos entre la sangre y los órganos linfoides es un proceso esencial para asegurar la homeostasis linfoide (Aurrand-Lions y cols., 2002b; Luster y cols., 2005; Bajenoff y cols., 2007; Germain y cols., 2008). Los linfocitos migran desde la sangre hacia los tejidos y desde estos al torrente circulatorio a nivel de estructuras vasculares especializadas llamadas vénulas de endotelio alto (HEV, *High Endothelial Venules*). Estas estructuras expresan la maquinaria molecular necesaria para adecuar la migración transendotelial (TEM, *TransEndothelial Migration*) de los linfocitos tras un proceso de intercambio de señales moleculares (Luster y cols., 2005) (Figura 1). En muchos estados patológicos, la migración leucocitaria puede tener lugar a nivel de vénulas endoteliales que son estimuladas localmente vía distintas señales, incluyendo citocinas pro-inflamatorias (Luster y cols., 2005; Rodrigo Mora y Von Andrian, 2006).

Durante la extravasación, los linfocitos y células endoteliales intercambian señales bidireccionales que dan lugar a modificaciones recíprocas en su comportamiento (Alon y Luscinskas, 2004; Muller, 2009; Wittchen, 2009) (Figura 1). Actualmente, el proceso de extravasación es entendido como una cascada de pasos de adhesión entre ambos tipos celulares que incluyen los siguientes contactos linfocito-endotelio: (1) rodamiento e inmovilización; (2) adhesión firme; (3) rastreo; y (4) diapédesis o transmigración, seguido de invasión tisular (Dunon y cols., 1996; Aurrand-Lions y cols., 2002a; Imhof y Aurrand-Lions, 2004; Luster y cols., 2005).

Quimiocinas en la superficie luminal de las células endoteliales pueden activar sus receptores en los linfocitos rodantes lo que dispara la adhesión firme a través de integrinas (Springer, 1994; Campbell y cols., 1998). Entre las quimiocinas estudiadas por su implicación en la migración de linfocitos B, las B-LLC migran en respuesta a gradientes de CCL19 y CCL21, apuntando a CCR7 como receptor funcional de quimiocinas en B-LLC (Till y cols., 2002; Lopez-Giral y cols., 2004). Algunos datos sugieren que los niveles de expresión de CCR7 en las B-LLC podrían correlacionar con la linfadenopatía (Till y cols., 2002; Lopez-Giral y cols., 2004) y con

la expresión de ZAP-70 y CD38 (Richardson y cols., 2006). Además, recientemente se encontró que anticuerpos anti-CCR7 (anti-, se abreviará como α -) podían causar citotoxicidad dependiente de complemento contra células B-LLC representando, por tanto, una diana potencial para la eliminación de estas células (Lopez-Giral y cols., 2004). En conjunto, estos trabajos sugieren que CCR7 podría jugar un papel crítico en el tráfico y migración de células B-LLC a los tejidos linfoides. Otra quimiocina descrita en LLC y migración a tejidos es SDF-1 α y su principal receptor, CXCR4 (Burger y cols., 1999; Till y cols., 2002; Trentin y cols., 2004). También la expresión de CXCR5 en células B-LLC ha sido asociada funcionalmente con la migración de éstas en respuesta al ligando CXCL13, si bien su papel en la extravasación no ha sido totalmente demostrado.

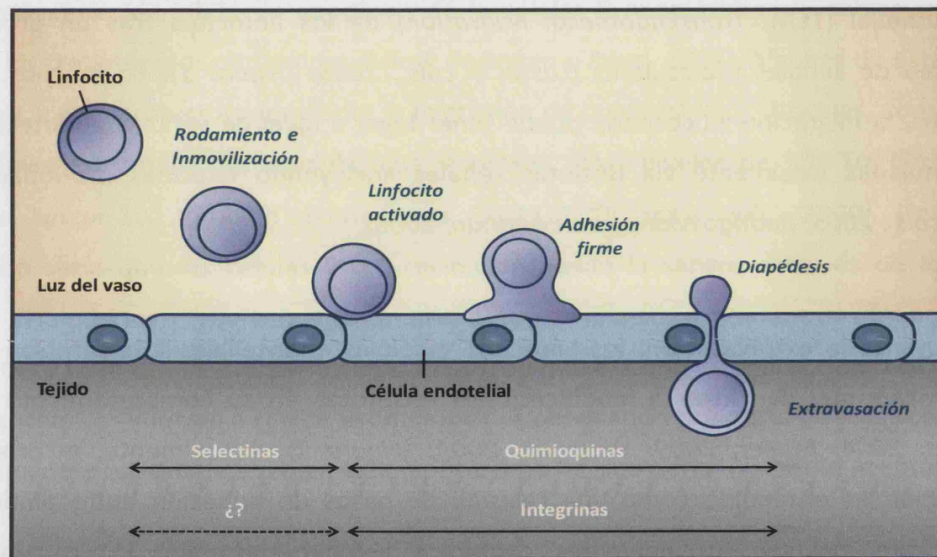


Figura 1. Migración de los linfocitos B. Los linfocitos atraídos por quimiocinas, tienden a abandonar la luz del vaso, en dirección al origen de producción de esas mismas quimiocinas, hacia una concentración mayor. Los primeros contactos con las células endoteliales provocan la activación de los dos tipos celulares implicados. Las selectinas intervienen principalmente en las primeras fases de la migración linfocitaria, mientras que las integrinas, que están presentes durante todo el proceso, cobran especial importancia en las últimas. Adaptado de Kinashi, 2005.

Otras moléculas de adhesión implicadas en el tránsito linfocitario, parecen ser importantes también para la migración de B-LLC. Así, las B-LLC expresan varias integrinas (De Rossi y cols., 1993; Vincent y cols., 1996) como la subunidad $\beta 1$, expresada constitutivamente, y las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\alpha 5$ que se expresan de manera variable. De ellas, la integrina $\alpha 4\beta 1$ parece ser necesaria para la migración transendotelial y su expresión ha sido relacionada

con linfadenopatía (Till y cols., 2002). No obstante, las B-LLC expresan niveles realmente bajos de las mismas como ha sido recientemente demostrado (Hartmann y cols., 2009). Además, las células B-LLC presentan niveles de expresión variables de selectinas como CD62L (Anexo I) (Jewell y Yong, 1997) cuyo papel en la diapédesis *in vitro* de LLC ha sido sugerido (Chen y cols., 1999). Otra molécula fuertemente expresada en las células B-LLC es CD44 (Anexo I) (De Rossi y cols., 1997; Eisterer y cols., 2004) habiendo sido correlacionados sus niveles en suero con un peor pronóstico de la enfermedad (De Rossi y cols., 1997; Eisterer y cols., 2004).

Como comentábamos al inicio de este apartado, a pesar de todas estas evidencias no quedaba definitivamente claro si las B-LLC realmente migran “correctamente” o si, a pesar de portar numerosas moléculas implicadas en la migración normal de linfocitos a tejidos linfoides secundarios, podrían presentar un comportamiento alterado.

1.6.2.- LLC y supervivencia

Clásicamente, como comentábamos anteriormente, la LLC había sido considerada como una acumulación gradual de células leucémicas resistentes a muerte celular lo que podría explicar su acumulación en sangre (Dameshek, 1967; Dighiero y cols., 1991; Caligaris-Cappio, 2000). Sin embargo, este concepto cambió posteriormente al observarse que las células leucémicas morían rápidamente en cultivo (Collins y cols., 1989; McConkey y cols., 1991). En este sentido, diversos estudios han tratado de determinar qué factores median en la supervivencia de las B-LLC en el individuo incluyendo el contacto con diversos tipos celulares como células T (Plander y cols., 2009), células dendríticas (Pedersen y cols., 2002), NLC (NurseLike Cells) (Tsukada y cols., 2002), células estromales de médula ósea (Panayiotidis y cols., 1996; Lagneaux y cols., 1998) y células endoteliales (Long y cols., 1995; Moreno y cols., 2001; Zucchetto y cols., 2009; Buggins y cols., 2010); distintos componentes de la matriz extracelular, como fibronectina, y distintos factores solubles liberados, principalmente, por los tipos celulares anteriormente mencionados, incluyendo IL-6 y IL-8 (interleuquinas 6 y 8), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) (Mainou-Fowler y Prentice, 1996; Reittie y cols., 1996; Moreno y cols., 2001; Munk Pedersen y Reed, 2004), pero también factores solubles liberados por las propias B-LLC como IL-7 (Long y cols., 1995) o

MMP-9 (*Redondo-Munoz y cols., 2010*). Sin embargo, en el suero de pacientes con LLC no se han encontrado factores solubles como los mencionados, que permitan *per se* la supervivencia de B-LLC en cultivo *in vitro*. Es posible, por tanto, que una combinación de ambos, contactos celulares y factores solubles, sean necesarios para prevenir la apoptosis de las B-LLC *in vivo*.

Algunos autores habían planteado, pero no firmemente demostrado, que las células endoteliales vasculares pudieran proporcionar señales de supervivencia a las células B-LLC circulantes dada su acumulación progresiva en este compartimento. No obstante, ensayos con líneas endoteliales, como ECV40 (*Moreno y cols., 2001*) o EAhy.926 (*Long y cols., 1995*), mostraron resultados contradictorios en lo que al contacto celular se refería. Además, en ambas aproximaciones las células se habían mantenido durante varios días en co-cultivo, por lo que la acumulación de factores de crecimiento, incluidos los del suplemento adicionado para el crecimiento de las líneas, podrían influir en los resultados observados. Por tanto, el posible papel de los contactos B-LLC-endotelio, como comentábamos, resultaba controvertido, argumentándose que los factores solubles liberados por las células endoteliales, a través de IL-6 (*Moreno y cols., 2001*), o las propias B-LLC, como IL-7 (*Long y cols., 1995*), podrían contribuir a la supervivencia de las B-LLC. En este sentido, las células endoteliales no sólo juegan un papel esencial en distintas neoplasias a través de la neovascularización de los infiltrados, suministrando nutrientes u O₂ a los mismos, sino también a través de la liberación de factores de crecimiento o contactos celulares mediados por moléculas de adhesión como ICAM-1 (CD54, *Anexo I*), VCAM-1 (CD106, *Anexo I*) o ácido hialurónico (revisado en *Butler y cols., 2010*).

Resultaba importante, por tanto, determinar el papel del endotelio en la supervivencia de las B-LLC circulantes.

2.- Receptores de membrana tirosina quinasa Eph y ligandos, ephrin (EFN)

La familia de moléculas Eph y sus ligandos, ephrin (EFN), es la mayor familia de receptores de membrana con actividad tirosina-quinasa que se conoce. Participan en multitud de procesos durante la embrio/morfogénesis, como el posicionamiento celular o la guía de axones, en vasculogénesis y angiogénesis y, aunque su función es menos conocida, también están implicados en la homeostasis de los tejidos adultos y en cáncer (Merlos-Suarez y Batlle, 2008; Pasquale, 2008; 2010). La mayoría de procesos controlados por Eph/EFN durante el desarrollo y la homeostasis tisular, como la definición de la organización tisular, el establecimiento de los circuitos neuronales o la angiogénesis, están “finamente” regulados a través del control coordinado de su expresión, tanto espacial como temporal (Pasquale, 2005; 2008). Eph/EFN ejercen su acción a través de mecanismos de atracción/repulsión celular regulando, en muchos casos, la adhesión celular al sustrato y/o a otros tipos celulares, vía integrinas o cadherinas (Pasquale, 2008; 2010), a través de su conexión con distintos componentes del citoesqueleto modificando la forma y el movimiento celular. También han sido implicadas directa o indirectamente en otros procesos como las respuestas quimiotácticas (Pasquale, 2008; 2010), la supervivencia y/o la proliferación celular (Pasquale, 2008; 2010).

Actualmente se distinguen dos subfamilias Eph, A y B, basándose en la homología del dominio de unión al ligando lo que determina, en la mayoría de los casos, su mayor afinidad por ligandos de clase A (anclados a la membrana plasmática vía GPI) o de clase B (con un dominio transmembrana). Tanto Eph como EFN pueden señalizar hacia la célula que las expresa (señales “forward” y “reverse”, respectivamente) lo que implica, frecuentemente, una señalización bidireccional de la interacción Eph/EFN y un papel autónomo o no de célula que las expresa (Davy y Soriano, 2005; Pasquale, 2008; 2010).

En cáncer, Eph y EFN juegan un papel crítico en distintos aspectos tan importantes como la neoangiogénesis asociada al tumor (Brantley-Sieders y cols., 2004; Brantley-Sieders y Chen, 2004) o la generación de metástasis (Campbell y cols., 2008; Castano y cols., 2008; Merlos-Suarez y Batlle, 2008; Pasquale, 2010). En algún caso, además, alteraciones en su expresión (neoexpresión o desaparición, en relación al tipo celular “normal”) han sido correlacionadas con la progresión del tumor, por lo que podrían actuar como promotoras o

inhibidoras tumorales, además de como marcadores pronóstico, entre otros, en cáncer de colon, pulmón, mama, próstata o melanoma (Campbell y cols., 2008; Castano y cols., 2008; Merlos-Suarez y Batlle, 2008; Pasquale, 2010). Sobre esta base, se están desarrollando nuevos fármacos antitumorales basados en la anulación dirigida de ciertas Eph, como EphB4 y EphA2 (Kertesz y cols., 2006; Campbell y cols., 2008; Castano y cols., 2008; Merlos-Suarez y Batlle, 2008; Pasquale, 2010).

Por otra parte, un número creciente de trabajos han demostrado expresión y posible función en sistema inmune de estas moléculas, aunque la mayoría de estos estudios se han centrado en la fisiología del timo y los linfocitos T (Yu y cols., 2004; Munoz y cols., 2006; Alfaro y cols., 2007; Hjorthaug y Aasheim, 2007; Garcia-Ceca y cols., 2009) siendo más escasos los estudios en linfocitos B (Aasheim y cols., 1997) o neoplasias linfoides (Boyd y cols., 1992; Wicks y cols., 1992; Fu y cols., 1999), donde podrían resultar potencialmente relevantes.

2.1.- Estructura de Eph y EFN

Los receptores Eph [*Erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma*, (Hirai y cols., 1987)] son proteínas tirosina quinasa con un único dominio transmembrana, cuyos dominios intra- y extra-celular están muy conservados entre los distintos miembros (Figura 2). El dominio extracelular del receptor, extremo N-terminal glicosilado, contiene el sitio de unión al ligando, una región rica en cisteínas que contiene un motivo similar al factor de crecimiento epitelial (EGF-like) y dos repeticiones fibronectina tipo III. El único dominio transmembrana que presentan estos receptores conecta la parte extra-citosólica con la citosólica, la cual incluye una región yuxtamembrana con dos tirosinas conservadas, (Kullander y Klein, 2002), un dominio tirosina quinasa, un motivo α -estéril (SAM) y un motivo de unión PDZ C-terminal (Kullander y Klein, 2002; Irie y cols., 2005). Basándose en la homología de secuencia del dominio extracelular, los receptores Eph se clasifican en clase A o B, lo cual está asociado, como hemos comentado anteriormente, con su mayor afinidad por ligandos tipo A, proteínas ancladas a membrana mediante dominio GPI, o tipo B, proteínas con un dominio transmembrana (Figura 2).

Los ligandos, ephrin (**Eph receptor interacting protein**) (**EFN**), también considerados como contra-receptores por la posibilidad de señalizar hacia las células que los expresan, fueron denominados en un principio LERK (**Ligands for Eph-Related Kinases**)(Beckmann y cols., 1994) y presentan en su dominio extracelular los sitios de unión al receptor de alta o de baja afinidad (Figura 2).

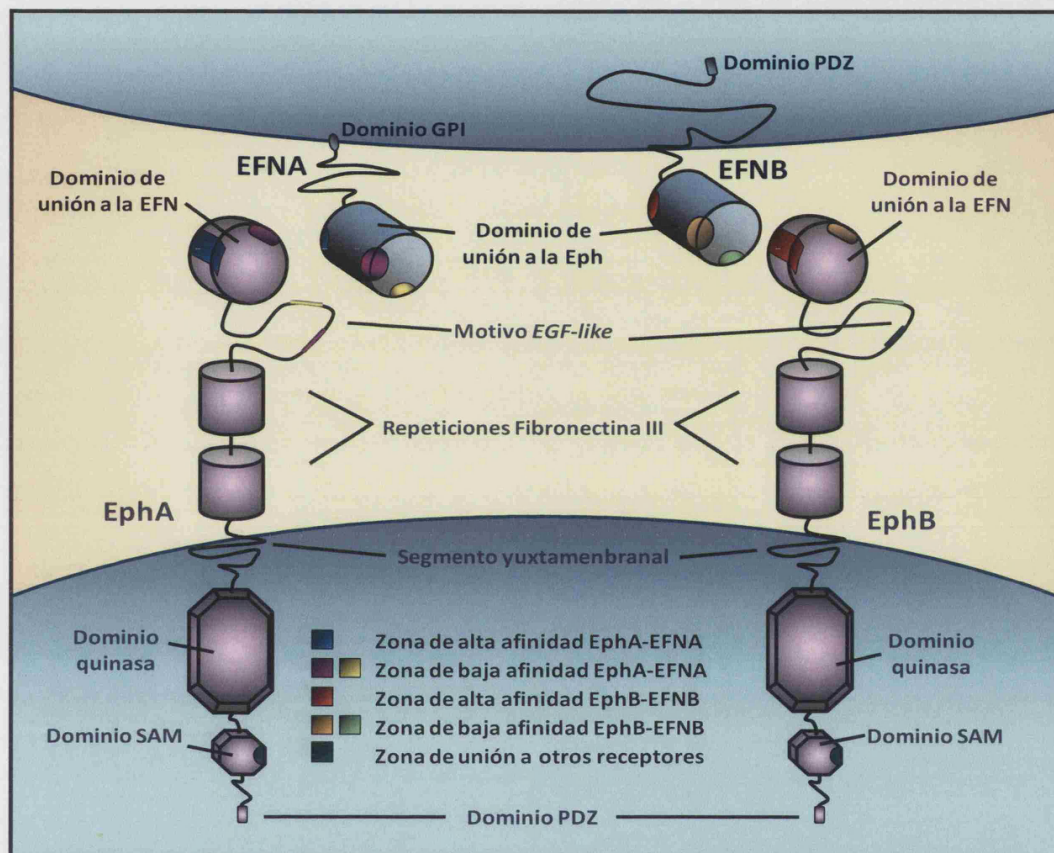


Figura 2. Estructura molecular de Eph y EFN. Los receptores Eph constan de un dominio N-terminal de unión al ligando, la que determinará su pertenencia a una u otra familia, una región rica en cisteínas, que contiene un motivo similar al factor de crecimiento epitelial (EGF-like) y dos repeticiones fibronectina tipo III, un dominio transmembrana, un dominio tirosina quinasa, un motivo SAM y un motivo de unión PDZ (motivo de unos 90 aa, dominio de interacción proteína-proteína). Las EFNA presentan un dominio GPI, formado por una molécula de fosfatidilinositol, una cadena de carbohidratos y una porción de fosfatidiletanolamina que se conecta al extremo C-terminal de la proteína, mientras que las EFNB constan de un dominio transmembrana, para anclarse a la membrana y un dominio PDZ. Adaptado de Pasquale, 2005.

En vertebrados se han observado diez EphA (EphA1-EphA10) y seis EphB (EphB1-EphB6), si bien EphA6 y EphB5 no han sido encontradas en mamíferos (Murai y Pasquale, 2003), y seis EFNA (EFNA1-EFNA6) y tres EFNB (EFNB1-EFNB3), si bien EFNA6 no ha sido descrita en mamíferos (Murai y Pasquale, 2003).

Las estructuras descritas para receptores y ligandos son estándares y válidas para la mayoría de los miembros de esta familia. Sin embargo, existen algunos miembros que difieren ligeramente del prototipo descrito, como por ejemplo EphA10 y EphB6, cuyo dominio tirosina quinasa carece de ciertos residuos esenciales para la actividad catalítica, lo que afecta a su funcionalidad, como se detallará posteriormente.

Una característica de esta familia de moléculas es la existencia de isoformas resultantes de procesamiento alternativo (*splicing*) del ARNm que pueden dar lugar, tanto a isoformas solubles como alteradas en su funcionalidad y que, como señalaremos más adelante, podrían representar una manera de controlar las interacciones. Actualmente, se conocen numerosas formas de *splicing* alternativo para distintos miembros (entre paréntesis los accesos al *GeneBank* de manera correlativa, variante 1, variante 2, etc., excepto para EphA10, que se indican los de la variante 2 y 3): EphA3 (NM_005233.5 y NM_182644.2), EphA5 (NM_004439.5 y NM_182472.2), EphA6 (NM_001080448.2 y NM_173655.2), EphA8 (NM_020526.3 y NM_001006943.1), EphA10 (NM_173641.2 y NM_001099439.1), EphB2 (NM_017449.3 y NM_004442.6), EFNA1 (NM_004428.2 y NM_182685.1), y EFNA4 (NM_005227.2, NM_182689.1 y NM_182690.2).

2.2.- Interacción y señalización de Eph/EFN

Una propiedad fundamental en las interacciones receptor-ligando de Eph/EFN es su promiscuidad intraclase presentando, no obstante, diferentes afinidades en su unión. Existen, además, excepciones como EphA1, que sólo une EFNA1, o EphA4, que une EFN tipo A y tipo B, o EphB2, que une EFN tipo B, pero también EFNA5 (Pasquale, 2005).

Las zonas de unión de alta y baja afinidad, presentes tanto en receptores como en ligandos, resultan cruciales en la transmisión de señales, regulando el grado de agregación de receptores y ligandos en la membrana, necesario para la transmisión de señales intracelulares y para determinar el grado y/o tipo de señalización. Los sitios de unión de alta afinidad (de orden nM) intervienen en el contacto inicial receptor-ligando, generando la formación de heterodímeros, mientras que los sitios de baja afinidad (de orden μM) favorecen la formación de tetrámeros a partir de los heterodímeros (Figura 3) (Pasquale, 2005). La importancia del grado de agregación es tal que la dimerización es necesaria y suficiente para la fosforilación del dominio yuxtamembrana mientras que la tetramerización favorece la fosforilación del resto de residuos o dominios tirosina (Kullander y Klein, 2002).

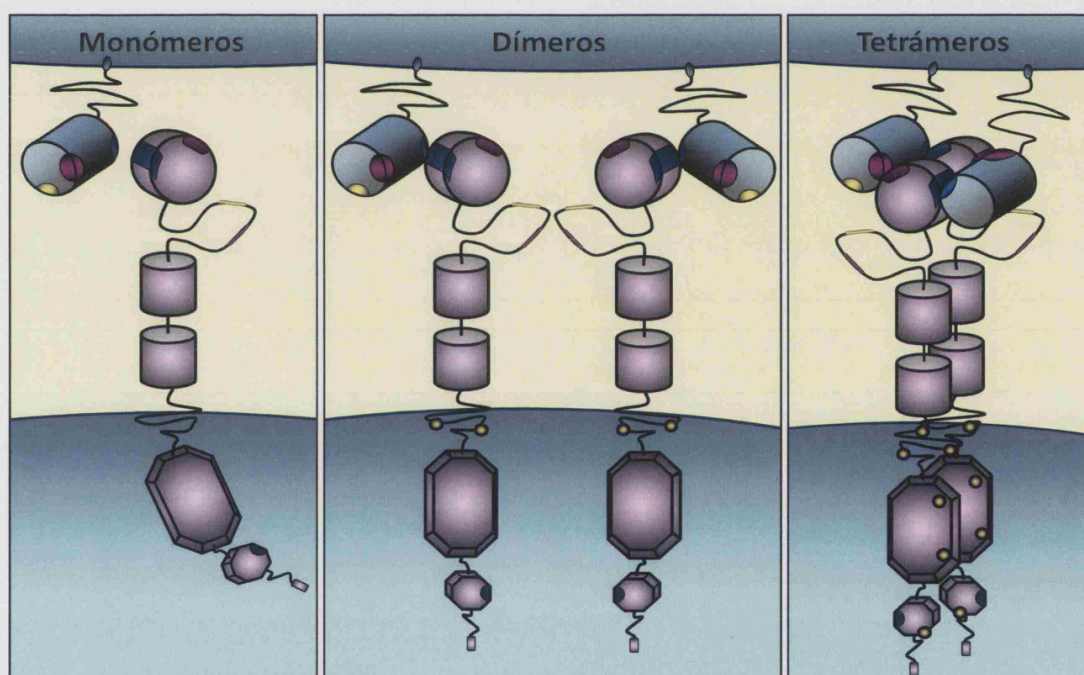


Figura 3. Interacción entre Eph y EFN. Receptores y ligandos establecen su primer contacto a través de las zonas de alta afinidad (nM). Este contacto genera fosforilaciones (representados como círculos amarillos) en el dominio yuxtamembrana, lo que permite un cambio conformacional, que prepara a la molécula para su activación. Además de estas zonas de alta afinidad, en las zonas de unión receptor-ligando encontramos otras de baja afinidad (μM) situadas en contraposición con las de alta, que facilitará la formación de tetrámeros, haciendo extensiva la fosforilación. Adaptado de Pasquale, 2005.

2.3.- Señalización a través de receptores Eph (señal forward) o de ligandos EFN (señal reverse)

Los primeros estudios de Eph/EFN se centraron en la caracterización de la actividad tirosina quinasa de los receptores Eph. Estudios posteriores demostraron que las EFN también podían transmitir señalización hacia el interior de la célula portadora por lo que, para distinguir la dirección de la señal se acuñó el nombre de señal adelante o *forward* para las primeras y señal inversa o *reverse* para las segundas (Steube y cols., 1999).

La señalización de receptores Eph tiene lugar, principalmente, mediante la formación de complejos receptor-ligando. La formación de los dímeros Eph-EFN provoca la fosforilación de los residuos tirosina situados en el dominio yuxtamembrana (Himanen y Nikolov, 2003). Esta fosforilación induce un cambio conformacional (Figura 3) que provoca la liberación del dominio tirosina-quinasa inactivo, el cual adquiere una correcta alineación para su activación y para la autofosforilación de los residuos tirosina (Binns y cols., 2000; Zisch y cols., 2000; Kullander y cols., 2001). Las fosforilaciones acontecidas tras la formación de tetrámeros, tanto de los residuos tirosina del dominio yuxtamembrana como de los dominios quinasas y SAM, inician una cascada de señalización hacia el interior celular (Figura 4). Esta señalización se postula como la principal, aunque también se han definido nuevos modos de señalización en Eph independientes de la actividad catalítica e, incluso, independientes de unión del ligando (Kullander y Klein, 2002).

En la Figura 4 se describe un ejemplo de cascada de señalización descrita para EphA. La cascada de señalización *forward* puede propagarse, tanto de manera dependiente al dominio tirosina-quinasa, a través de la familia Rho GTPasas y ERK/MAPK, como de manera independiente al mismo, a través del dominio yuxtamembrana, cuyos residuos tirosinas fosforilados son capaces de unirse a proteínas adaptadoras con motivos de unión a actina y a proteínas RasGAP, quienes a su vez inhiben la ruta ERK/MARK. Consecuencia de estas diferentes uniones, las cuales se detallan en profundidad en la Figura 4, la señal *forward* está implicada fundamentalmente en procesos de adhesión y regulación del citoesqueleto, a través de la regulación de la expresión de integrinas.

En la *Figura 5* se describen ejemplos de cascada de señalización descrita para EFN. A pesar de que la cascada de señalización a través de EFNA no es totalmente conocida, los datos disponibles acerca de su señalización (más detallados en la *Figura 5*) parecen indicar que la activación a través del dominio GPI y su interacción con otros componentes de las balsas lipídicas, potencian la adhesión dependiente de integrina a través de MARP, capaz de regular su expresión, como se ha observado en sistema neural (Davy y cols., 1999; Davy y Robbins, 2000; Huai y Drescher, 2001). Al contrario que para EFNB, para EFNA no se han descrito mecanismos de señalización en relación con quimiocinas.

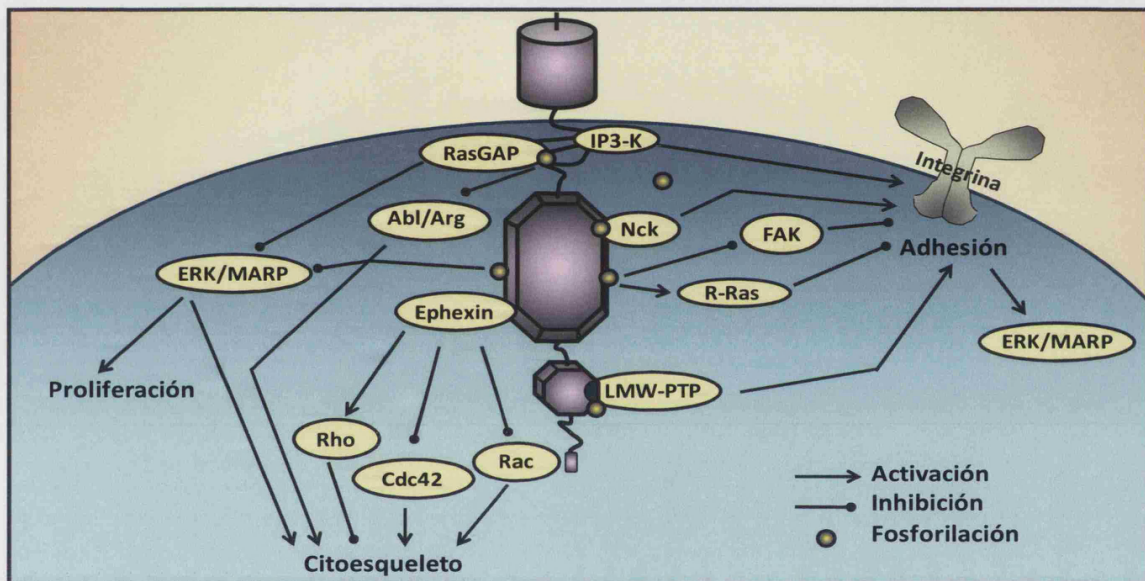


Figura 4. Señalización forward. Adaptado de Kullander y Klein, 2002. La cascada de señalización forward está implicada fundamentalmente en procesos de adhesión, regulación del citoesqueleto y, en algún caso, con proliferación. Esta señal parece capaz de regular los procesos de adhesión, entre otros, mediante moléculas que modulan la expresión de integrinas, tanto de manera dependiente como independiente a su actividad tirosina-quinasa, tanto aumentando la expresión de las integrinas, a través del reclutamiento de **LMW-PTP** (Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase) en el dominio SAM, a través de la proteína adaptadora **Nck** tras producirse la fosforilación del dominio quinasa, o a través de **IP3-K**, tras fosforilarse los residuos tirosina del dominio yuxtamembrana; como disminuyendo esta expresión a través de las rutas **R-Ras** y **FAK** (Focal Adhesion Kinase), las cuales se activan tras fosforilarse el dominio quinasa. La señal forward es capaz también de regular el citoesqueleto de manera dependiente e independiente de su actividad tirosina-quinasa. De manera dependiente lo regula a través de la familia **Rho GTPasas**, encontrándose en receptores EphA, una molécula intercambiadora de guaninas, **Ephexin** (Eph-interacting exchange protein), que interactúa con los miembros de esta familia. La señal forward activa a **RhoA**, mientras que inhibe a **Cdc42**, **Rac1**, conduciendo estas tres actuaciones a repulsión celular en neuroblastomas. De manera independiente lo hace a través del dominio yuxtamembrana, sus residuos de tirosina fosforilados, pueden unirse a proteínas adaptadoras, como son **Abl** (abreviatura de Abelson) y **Arg** (Abl related gene), las cuales presentan un motivo de unión a actina. Los residuos tirosina fosforilados del dominio yuxtamembrana también pueden unirse a **RasGAP** (RAS GTPase-Activating Protein), que a su vez inhibe la ruta **ERK/MAPK** (Extracellular-signal-Regulated Kinase/Mitogen-Activated Protein Kinase), ruta que también puede ser regulada mediante el dominio tirosina-quinasa. Estas últimas son capaces de translocarse al núcleo donde modulan la expresión de diferentes genes, entre ellos, genes que regulan citoesqueleto y/o proliferación.

Eph y EFN utilizan efectores intracelulares comunes importantes para la organización del citoesqueleto y la adhesión celular tales como quinasas de la familia Src o GTPasas de la familia Ras/Rho como, por ejemplo, Shp2, Shc-Grb2, Cas-Rap1, SPAR/E6TP1, α 2-chimaerin, FAK, Ship2, Abl-Crk. En algunos casos, se han descrito interacciones más restringidas como la de ciertas EphA y la familia Ephexin o EphB y Kalirin, Tiam1 (*Pasquale, 2008*).

El hecho de que, tanto el receptor como el ligando, se encuentren anclados a membrana implica que las interacciones Eph/EFN conllevan, generalmente, interacción célula-célula por lo que tanto la célula portadora del receptor como la del ligando pueden recibir señales (señalización bidireccional) (*Pasquale, 2005*), remarcando la importancia del papel autónomo o no autónomo de célula de los miembros que interaccionan (revisado en *Davy y Soriano, 2005*). En condiciones experimentales, es posible inducir agregación de receptores (*Kullander y Klein, 2002*) o ligandos (*Palmer y cols., 2002*) mediante la utilización de proteínas recombinantes conteniendo los dominios extracelulares de unión que, en algunos casos, pueden conducir a señalización en las células que los unen. De esta manera, es posible discriminar en los diversos procesos celulares en estudio el papel autónomo del papel no autónomo de cada uno de los miembros implicados.

2.4.- Regulación de la señalización

Una característica fundamental de las interacciones mediadas por Eph/EFN es la de ser contexto dependiente, lo que aumenta la complejidad de las mismas. De hecho, pueden llegar a observarse efectos contrarios determinados, en muchos casos, por el grado y tipo de agregación de receptores y ligandos que se establece (*Smith y cols., 2004*). Las transforilaciones (*Figura 6 A*), que tendrán lugar bajo una determinada orientación de los dominios quinasas de los receptores, van a ayudar a propagar la señal más allá del estricto sitio de contacto célula-célula, potenciándola (*Kalo y Pasquale, 1999; Knoll y Drescher, 2004*). La existencia de receptores carentes de actividad catalítica o truncados, como EphA10 y EphB6 (*Figura 6 B*), además de indicar que podrían existir otros mecanismos de señalización independientes de la misma como ha sido recientemente demostrado (*Murai y Pasquale, 2003*), suponen un freno en la propagación de la señal, impidiendo la transforilación (*Freywald y cols., 2002*). De la misma manera, la propagación de la señal también se puede

ver interrumpida por la interacciones en *cis* (Figura 6 C) dado que, frecuentemente, la misma

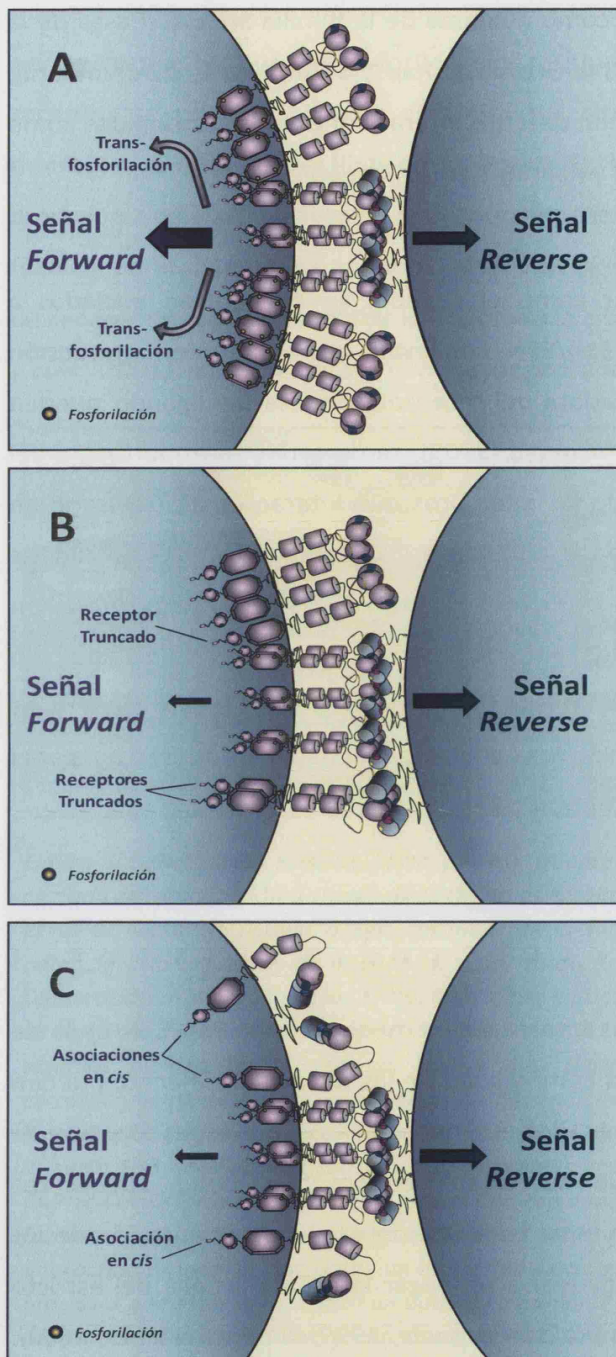


Figura 6. Regulación de la Señal. A través de asociaciones laterales, la señal forward o reverse, se puede intensificar, mediante transfosforilaciones (A), frenarse, mediante receptores truncados (B), o atenuarse, mediante asociaciones en *cis* (C). Adaptado de Pasquale, 2005.

célula expresa receptores y ligandos cuya ubicación en balsas lipídicas puede contribuir a estas asociaciones (Yin y cols., 2004), postulándose como un mecanismo regulador más cuya capacidad de transmitir señalización no ha sido aún demostrada (Autiero y cols., 2005). Ambos mecanismos, receptores truncados y asociaciones en *cis*, influyen en la intensidad y tipo de señal (Figura 6) (Wi y cols., 1997; Bruckner y cols., 1999; Hui y Drescher, 2001).

Como consecuencia de la modulación de la intensidad de la señal a través del grado de asociación de esas proteínas, puede incluso cambiarse la naturaleza de la respuesta, de modo que alcanzado un cierto umbral el efecto observado puede ser el contrario, como pasar de un fenómeno de adhesión a uno de repulsión (Stein y cols., 1998).

En un contexto de señalización bidireccional, el balance final de las señales también parece regular la respuesta celular. Algunos estudios han mostrado que cuando la señal se propaga bidireccionalmente se obtiene un efecto de repulsión entre ambos tipos celulares, mientras que cuando se da de manera

unidireccional, el efecto provocado era el de adhesión (Mellitzer y cols., 1999). Otros estudios apuntan a que el balance global de las señales *forward* y *reverse* podría ser determinante, de manera que cuando ambas señales están presentes en una misma célula, los efectos observados son de adhesión celular (Dravis y cols., 2004).

Otro factor que podría contribuir en determinados contextos al efecto producido es el de responder a períodos de tiempo, de manera que un proceso que podría comenzar con una respuesta de adhesión/atracción puede cambiar a repulsión tras un tiempo determinado (Hattori y cols., 2000; Marston y cols., 2003).

2.5.- Regulación de adhesión celular por Eph/EFN

Uno de los procesos celulares regulados por las interacciones Eph/EFN es la adhesión, tanto célula-célula como célula a sustrato. Como comentábamos en apartados anteriores, el resultado de la interacción puede ser, tanto de adhesión como repulsión actuando, por tanto, como guías moleculares en multitud de procesos dinámicos tales como la guía de axones, la angiogénesis, la organización celular en tejidos o la plasticidad neuronal en el adulto.

Los primeros trabajos sobre la funcionalidad de Eph/EFN demostraron su implicación en fenómenos de repulsión en muchos tipos celulares (Flanagan y Vanderhaeghen, 1998; Wilkinson, 2001; Knoll y Drescher, 2002), adquiriendo esta familia gran importancia en procesos relacionados con adhesión y migración celular, puesto que se han demostrado capaces de provocar la separación celular y de prevenir la mezcla de poblaciones celulares con expresiones diferenciales en Eph-EFN, (Gallo y cols., 2002; Gallo y Letourneau, 2004), resultando paradójico que el contacto previo de células provoque la posterior separación celular. Para que estos efectos repulsivos tengan lugar, lo primero que debe ocurrir es la separación del complejo receptor-ligando. Aunque la disociación del complejo podría parecer el mecanismo más lógico, la alta afinidad de las uniones Eph-EFN no permite que esto sea así (Hattori y cols., 2000; Zimmer y cols., 2003) habiéndose encontrado dos mecanismos para la separación de estos complejos: endocitosis y liberación proteolítica (Figura 7). En el primero de ellos, se ha observado que complejos Eph-EFN se internalizan en vesículas que contienen parte de ambas membranas celulares (Marston y cols., 2003; Zimmer y cols., 2003) (Figura 7

A). No se conoce, no obstante, si estos complejos se internalizan junto con otras proteínas que co-localicen con ellos, o si los complejos internalizados son capaces de continuar la señalización.

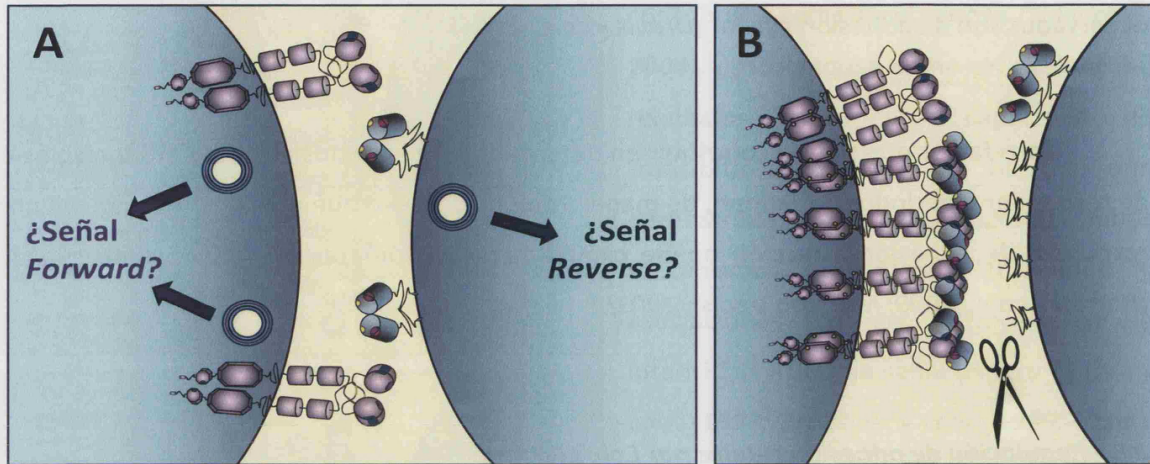



Figura 7. Mecanismos de separación de los complejos Eph-EFN. Debido a la gran afinidad que presenta la unión entre receptor y ligando, no se baraja la hipótesis de que esta unión se separe, de manera, que se barajan, principalmente, dos mecanismos, para se produzca la separación de estos complejos: **A)** endocitosis y **B)** liberación proteolítica. Adaptado de Pasquale, 2005. Las tijeras representan a la metaloproteasa ADAM10, las vesículas se representan como .

La liberación proteolítica a través de ADAM10 (des-integrina y metaloproteasa10) se identificó como la responsable de cortar el dominio extracelular de la EFNA2 (Figura 7 B). Tras la unión de EphA3-EFNA2 se activa esta metaloproteasa, provocando el corte proteolítico (Hattori y cols., 2000). El conocimiento de este mecanismo es también limitado, actualmente se desconoce si las EFN monoméricas generadas como resultado de este corte proteolítico pueden inhibir la señalización o si este corte proteolítico también podría darse en el ectodominio del receptor. En EFNB, se ha observado que la liberación proteolítica se puede dar a partir de la actividad serina-proteasa, aunque se desconoce si esta actividad está regulada (Pascall y Brown, 2004).

Se ha observado que la señalización a través de Eph/EFN es capaz de promover crecimiento axónico, formación de nuevos lamelopodios y filopodios, adhesión celular a la Matriz ExtraCelular (MEC) (Stein y cols., 1998; Hindges y cols., 2002; Nagashima y cols., 2002; Marston y cols., 2003; Hansen y cols., 2004), entre otros, poniendo de relevancia la capacidad de generar, por tanto, no sólo efectos repulsivos sino también adhesivos y atractivos. Aunque

tradicionalmente se han relacionado estos efectos adhesivos con la señalización *reverse*, ratones deficientes de EFNA5 y de EFN2 presentan defectos en el cierre del tubo neural y en el sistema excretor, respectivamente (Holmberg y cols., 2000; Dravis y cols., 2004), también existen evidencias que relacionan la señalización *forward* con estos efectos adhesivos/atractivos, ratones dobles mutantes para EphB2 y EphB3 presentan deficiencias en el sistema excretor (Dravis y cols., 2004). Los procesos adhesivos se han relacionado con una señalización débil, pudiendo cambiar a repulsivos cuando esta señalización se incrementa (Huynh-Do y cols., 1999; Hindges y cols., 2002; Hansen y cols., 2004). Apoyando a esta hipótesis se ha visto que cuando la forma alternativa de EphA7 que carece de actividad tirosina-quinasa, se encuentra en alta proporción respecto de la forma no truncada, la respuesta celular puede cambiar desde repulsión a adhesión (Holmberg y cols., 2000). Los receptores EphA10 y EphB6, quinasa inactivos, podrían producir cambios similares cuando se encuentran agrupados con otros receptores Eph catalíticamente competentes (Freywald y cols., 2002).

2.6.- Intercomunicación con otras moléculas de membrana

Aunque la señalización bidireccional es la mejor caracterizada para esta familia de moléculas, también pueden funcionar interaccionando con otras rutas de señalización o comunicación, en algún caso independientemente de interacción Eph-EFN. Entre las comunicaciones encontradas se ha descrito la relación con otros RTK (*Receptor Tyrosine Kinase*), como EGF (*Epithelial Growth Factor*) (Brantley-Sieders y cols., 2008), FGF (*Fibroblast Growth Factor*) (Arvanitis y Davy, 2008) o con PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) (Chong y cols., 2000); con receptores de canales de calcio, tipo NMDA (N-Metil D-Aspartato) (Yamaguchi y Pasquale, 2004); y con rutas de señalización tan importantes como las de la familia Wnt (Schmitt y cols., 2006; Arvanitis y Davy, 2008) o con proteínas que forman parte de uniones celulares, tanto de tipo oclusivo, como adherente, como de tipo comunicador.

Las claudinas, componentes de las uniones oclusivas, son capaces de interaccionar tanto con receptores como con ligandos, provocando regulación de la adhesión celular y permeabilidad celular (Arvanitis y Davy, 2008). Las E-cadherinas, principales responsables de las uniones adherentes, parecen regular la expresión de receptores Eph, su localización en la

superficie celular y su activación dependiente de la EFN, y puesto que también se ha observado que la señalización a través de EphB conduce a la localización de E-cadherina en la superficie celular, esta regulación resulta recíproca (*Ireton y Chen, 2005; Arvanitis y Davy, 2008*). Las conexinas, responsables de las uniones gap, también se han relacionado con esta familia tirosina-quinasa, donde la comunicación unidireccional, bien vía Eph bien vía EFN, parece ser suficiente para producir la inhibición en esta forma de comunicación celular (*Mellitzer y cols., 1999*). Recientemente se ha relacionado la interacción de Eph-EFN y las uniones gap con la separación celular (*Poliakov y cols., 2004*), la secreción de insulina (*Konstantinova y cols., 2007*) y la diferenciación osteogénica (*Davy y cols., 2006*).

2.7.- Eph/EFN en sistema inmune y cáncer

Muchos receptores Eph y EFN se expresan en órganos linfoides y linfocitos, sugiriendo que esta familia tiene propiedades inmuno-reguladoras (*Wu y Luo, 2005*). La mayoría de estudios al respecto se ha centrado en células T (*Yu y cols., 2004; Munoz y cols., 2006; Alfaro y cols., 2007; Hjorthaug y Aasheim, 2007; Garcia-Ceca y cols., 2009*), por suponer su diferenciación y maduración procesos donde contacto célula-célula resulta crítica, mientras que el estudio de estas moléculas en determinados órganos linfoides, como ganglios linfáticos y bazo es todavía preliminar, al igual que en células B.

En linfocitos T, los receptores EphB son probablemente activados tanto a través de interacciones con EFN expresadas por otras células T como por otros tipos celulares como células epiteliales tímicas y células presentadoras de antígenos (*Wu y Luo, 2005*). Las interacciones Eph-EFN afectan tanto a la organización estructural del timo (*Munoz y cols., 2006*) como a la guía de la migración de los timocitos (*Alfaro y cols., 2007*), a través de los diferentes compartimentos de este órgano en su maduración hacia células T. En ratones deficientes para EphA4 se observan defectos en la maduración tímica, que se traducen en un importante descenso en el número de células T periféricas, lo que parece atribuirse al desarrollo anormal de las células estromales de la corteza tímica las cuales, en condiciones normales, expresan EphA4 y estimulan la supervivencia y maduración de los timocitos (*Munoz y cols., 2006*). También se observa una desorganización del timo (*Garcia-Ceca y cols.,*

2009) y una reducción en el número de timocitos en ratones deficientes para EphB2 y EphB3 (Alfaro y cols., 2007).

Los estudios realizados sobre receptores Eph indican que estos parecen capaces de modular la respuesta del TcR (*T cell receptor*), representando una clase de receptores co-estimuladores. EphB6 es el receptor de esta familia mejor caracterizado en este aspecto (Wu y Luo, 2005). A pesar de carecer de dominio tirosina-quinasa, la estimulación de células T con α -EphB6 o con ligandos B, provoca un incremento en la fosforilación de tirosina y en la señalización intracelular, lo que se explica a través de la posible asociación entre EphB6 y otros receptores que sí poseen actividad catalítica, como son EphB1 y EphB4 (Wu y Luo, 2005; Yu y cols., 2006; Alfaro y cols., 2007). EphA y EFNA también se han relacionado con la modulación de la señalización a través de TcR, siendo capaces de modular la selección negativa de timocitos auto-reactivos, de la cual depende la apoptosis provocada por la fuerte activación del TcR (Wu y Luo, 2005; Freywald y cols., 2006). Además, el sistema EphA ha sido propuesto como modulador de la adhesión dependiente de integrina, en la respuesta migratoria de timocitos y células T a quimiocinas, las cuales guían los movimientos de timocitos dentro del timo, el tráfico de células T al sistema periférico, al tejido linfóide y la extravasación a otros tejidos (Wu y Luo, 2005; Hjorthaug y Aasheim, 2007). Al contrario que en linfocitos T, los estudios de Eph/EFN en linfocitos B son más escasos, conociéndose muy poco acerca de su función en la homeostasis de células B.

En cáncer, Eph/EFN están presentes en la mayoría de los tumores estudiados, donde generalmente su expresión está desregulada en relación al fenotipo normal (Ireton y Chen, 2005; Noren y Pasquale, 2007). Su sobreexpresión en diversos tipos de neoplasias como cáncer colorectal, de mama, próstata o piel ha sido relacionada tanto con funciones promotoras como inhibidoras de la tumorigenicidad y tanto *in vivo* como *in vitro* (Batlle y cols., 2005; Pasquale, 2008). En la mayoría de tumores analizados, los estudios se han centrado en el papel de receptores Eph mientras que el papel de EFN y su señal *reverse* en estas neoplasias es menos conocido aunque se ha visto su implicación en la transformación y en la migración/invasión de éstas (Meyer y cols., 2005; Campbell y cols., 2006; Tanaka y cols., 2007). El sistema Eph-EFN se ha visto también implicado en la neoangiogénesis asociada a tumores (Brantley-Sieders y Chen, 2004; Heroult y cols., 2006), pero también existen

evidencias de su posible papel en otros componentes del microambiente tumoral. Aunque escasos, los estudios de Eph/EFN en neoplasias linfoides evidencian cambios en la expresión de esta familia que en algunos casos pueden ir acompañados de cambios en su funcionalidad, confiriendo a la neoplasia nuevas capacidades. La forma truncada de EphA7 parece estar sobre-expresada en algunos linfomas B de centro germinal pobremente caracterizados (*Nakanishi y cols., 2007*), la sobre-expresión de EFNB1 en líneas celulares T-ALL (*Acute lymphoblastic leukemia*), se ha relacionado con una mayor capacidad invasiva de las células (*Jiang y cols., 2008*).

En resumen, el estudio de la expresión de la familia Eph/EFN en LLC, en primera estancia, representaba un novedoso e interesante abordaje y nos permitía posteriormente indagar si la posible des-regulación de esta familia de moléculas, en el caso de encontrarla, podría proporcionar a las células B-LLC diferentes capacidades que las ayudara en su progresión, indagando así en las lagunas de conocimiento de esta enfermedad, a la par que profundizamos en el conocimiento de su función en la biología del linfocito B sano.

Objetivos

El objetivo global del presente trabajo consiste en determinar la expresión y posible función de la familia de moléculas Eph/EFN en la Leucemia Linfática Crónica (LLC), concretamente, se pretende:

- Analizar qué miembros de tal familia son expresados por las células leucémicas aisladas de sangre periférica de pacientes LLC, en comparación con los expresados por los linfocitos B aislados de sangre periférica de donantes sanos.
- Evaluar la potencialidad de Eph/EFN como biomarcadores en el pronóstico de la LLC.
- Determinar si Eph/EFN median en procesos de adhesión, migración y supervivencia de las células B-LLC y cómo los mismos podrían contribuir a la patobiología de la enfermedad.
- Profundizar en el conocimiento de la posible función que esta familia de moléculas podría desempeñar en la biología del linfocito B.

Material y Métodos

1.- Pacientes

Este estudio cuenta con la aprobación de los Comités Éticos de Investigación Clínica de la UCM y de los hospitales Gregorio Marañón y Clínico San Carlos de Madrid, respetando los principios de la Declaración de Helsinki, promulgada por la Asociación Médica Mundial.

Las muestras de sangre periférica de pacientes LLC, previo consentimiento informado de los mismos, fueron proporcionadas por el Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid, respetando en todo momento el anonimato de los donantes. Los pacientes fueron diagnosticados por los especialistas clínicos del Servicio, atendiendo a criterios morfológicos e inmunofenotípicos de la enfermedad, cuyas características clínicas se describen en sub-apartados correspondientes de Resultados (*Tabla 9 y Tabla 11*). Las muestras proporcionadas se correspondían a pacientes no tratados o tratados al menos tres meses antes de la extracción de la muestra. Además, se dispuso de biopsias de tres linfadenopatías LLC y de cuatro ganglios control, de los cuales dos correspondían a ganglios reactivos (hiperplasia de células linfoides) y otros dos a ganglios centinelas sanos (procedentes de linfadenectomía sin infiltración tumoral), todos ellos proporcionados por el Servicio de Cirugía del Hospital Clínico San Carlos de Madrid previo consentimiento informado de los pacientes.

Las muestras de sangre periférica de pacientes LLC consistieron en sobrantes (0,5-1,5 mL) de las extracciones realizadas a los pacientes durante su seguimiento por parte de los especialistas clínicos o bien, en el caso de adenopatías o ganglios, de pequeñas porciones de biopsias destinadas a estudios anatomopatológicos de diagnóstico en el hospital.

2.- Procesamiento de muestras

2.1.- Aislamiento de células B, LLC o sanas, a partir de sangre periférica

Para la obtención de las poblaciones B analizadas en este estudio, las muestras de sangre periférica de donantes o pacientes LLC fueron sometidas a enriquecimiento, previo a su aislamiento, de la fracción leucocitaria mediante centrifugación (*Centrifuge 5810; Eppendorf, Hamburgo, Alemania; 400 g., 30 minutos, 22°C*), en medio

homogeneizado de alta densidad Histopaque-1077 (*Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos*). Los plasmas fueron recuperados de la fase superior y posteriormente congelados y almacenados (-80°C) para estudios posteriores. La fracción leucocitaria, enriquecida en la interfase Histopaque-plasma resultante de la centrifugación, se recuperó en PBS-EDTA-FCS (*Anexo III*). Tras el recuento celular en cámara de Neubauer (*BRAND GMBH + CO KG, Alemania*), las suspensiones celulares fueron procesadas acorde al objetivo de estudio.

2.1.1.- Aislamiento de células B, sanas o LLC, para extracción de ARN

En el caso de muestras B-LLC, en las que la proporción de células leucémicas CD5⁺CD19⁺ fue siempre mayor de un 60% de la suspensión celular total, se procedió al aislamiento de las células leucémicas siguiendo un protocolo de selección positiva de la población CD19 con tecnología MACS (*Magnetic-Activated Cell Sorting; Miltenyi Biotec, Alemania*), si la población CD19⁺CD5⁻ era menor al 5%. Para ello, las suspensiones celulares (10⁷ células/mL, en PBS-EDTA-FCS) se incubaban (30 minutos en frío) con anticuerpo de ratón específico de CD19 humano modificado con biotina (-b) (α -CD19-b, *BD Biosciences, Bélgica; Anexo II, Tabla 2*) en una proporción de 1 μ g/10⁷ células. Posteriormente, tras dos lavados previos (dilución en PBS-EDTA-FCS, centrifugación y nueva resuspensión del pellet y centrifugación), las suspensiones eran resuspendidas en PBS-EDTA-FCS 10⁸ células/mL y se incubaban (15 minutos, frío) con anticuerpos secundarios específicos frente a biotina unidos a partículas férricas (α -b-MACS, *Miltenyi Biotec*). Transcurrida la incubación, las suspensiones eran nuevamente lavadas y resuspendidas a una concentración final de 10⁸ células/0,5 mL o un volumen mínimo de 0,5 mL, siguiendo instrucciones del fabricante, para su posterior separación en un separador magnético automático (AutoMACS, *Miltenyi Biotec*). El programa de separación seleccionado para la selección positiva fue POSSEL, cuando la muestra contenía más de un 80% de células CD19⁺, o POSSEL_S, si la población de interés era menor de un 80%. Con la suspensión celular recuperada tras el aislamiento, se realizaba el recuento celular y el análisis de pureza mediante citometría de flujo, tiñendo una alícuota de la suspensión con estreptoavidina unida a Alexa-Fluor®488 (SAV-Alexa-Fluor®488; *Molecular Probes, Invitrogen, Grand Island, Nueva York, Estados Unidos; Anexo II, Tabla 5*), que debía unirse a la biotina con la

que está conjugada el α -CD19⁺, y α -CD5 PE-Cy5 (BD Biosciences; Anexo II, Tabla 1). En todos los casos, si la población recuperada presentaba más de un 99% de células SAV-Alexa-Fluor®488⁺ CD5⁺, éstas eran posteriormente procesadas para la extracción de ARN (ver más adelante).

En el caso de muestras LLC en las que la población CD19⁺CD5⁻ era mayor del 5%, el aislamiento positivo de células CD19⁺CD5⁺ se realizaba en dos pasos. En un primer paso, se eliminaban las células CD5⁺CD19⁻ (mayoritariamente linfocitos T CD2⁺) mediante un protocolo de depleción con MACS utilizando anticuerpos de ratón α -CD2 humano y seguidamente un anticuerpo secundario α -ratón unido a MACS (Miltenyi Biotec), manteniendo las condiciones de incubación como las descritas anteriormente para la selección positiva con α -CD19. Las suspensiones celulares eran separadas en AutoMACS utilizando el programa DEplete_S. Cuando la fracción celular negativa recuperada contenía menos del 0,1% de células CD19⁻CD5⁺, la población B-LLC CD5⁺CD19⁺, era aislada siguiendo un protocolo de selección positiva como el descrito anteriormente pero utilizando α -CD5-b (BD Biosciences; Anexo II, Tabla 2). Tras el recuento de las células recuperadas, se analizaba la pureza de la suspensión celular utilizando SAV-Alexa-Fluor®488 y α -CD19 unido a otro fluorocromo.

En el caso de sangre periférica de donantes sanos, la fracción leucocitaria obtenida después de la centrifugación en Histopaque-1077 solía contener menos del 15% de linfocitos B CD19⁺, los cuales no expresaban el antígeno CD5 o muy débilmente, por lo que era necesario enriquecer las suspensiones en esta población antes de su aislamiento. Para aislar esta población CD19⁺ se recurría a una selección positiva con MACS, como la descrita anteriormente, pero tras haber eliminado previamente la población de linfocitos T, por ser la población mayoritaria en estas muestras. Este primer paso se abordaba utilizando un protocolo de formación de rosetas de los linfocitos T con eritrocitos de carnero (SRBC, *Sheep Red Blood Cells*; Durviz, España) previamente tratados con *S*-(2-Aminoethyl) isothiuronium bromide hydrobromide (Sigma-Aldrich). Los SRBC así activados se incubaban con la población leucocitaria total manteniendo una proporción de 4 SRBC por cada célula de la suspensión, incubando la mezcla pre-concentrada en forma de pellet mediante

centrifugación (200 g., 18 minutos a 4°C) en hielo durante 1 hora. Posteriormente, el pellet era cuidadosamente resuspendido y tras añadir Histopaque-1077 se centrifugaba (800 g.) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se recogía la interfase que contenía la población de sangre periférica altamente empobrecida en linfocitos T, los cuales sedimentan junto con los eritrocitos en el fondo del tubo, y consiguientemente, con una proporción de linfocitos B superior, generalmente, al 40%. Sobre esta suspensión celular pre-enriquecida, se abordaba el protocolo de aislamiento por selección positiva de células CD19⁺ con tecnología MACS descrito anteriormente.

2.1.2.- Aislamiento de células B, sanas o LLC, para ensayos *in vitro*

El enriquecimiento de las poblaciones B, LLC o sanas, dedicadas a experimentos *in vitro*, como los que se detallan más adelante, se realizó mediante depleción de otras poblaciones, evitando así, que las células B de interés portaran anticuerpos unidos que pudieran afectar a los ensayos.

Para ello, las suspensiones celulares de la fracción leucocitaria enriquecida mediante centrifugación en Histopaque-1077 de muestras de sangre de pacientes LLC o las mismas de sanos pero tras depleción T por formación de rosetas, se incubaban con una mezcla de anticuerpos de ratón, α -CD2, α -CD3, α -CD14, α -CD13 y α -CD56 (BD Biosciences; Anexo II, Tabla 2), los cuales reconocen moléculas diana de poblaciones T, NK (*Natural Killer*), monocíticas y granulocíticas a descartar. Posteriormente, las suspensiones se incubaban con bolas magnéticas Dynabeads (*Dynal, Oslo, Noruega*), conjugadas a un anticuerpo secundario frente a IgG de ratón, en una relación de 4 bolas por cada célula diana. La separación de células unidas a bolas se realizaba colocando la suspensión celular incubada con bolas en un separador magnético Dynal. En todos los casos, se realizaron al menos dos rondas de separación para eliminar completamente las células unidas a anticuerpo. Las suspensiones celulares recuperadas tras la depleción estaban enriquecidas en células CD19⁺ en más de un 98%, en el caso de muestras LLC, o de un 90% cuando se trataba de donantes sanos.

2.2.- Procesamiento de ganglios linfáticos

El estudio de Eph/EFN en ganglios linfáticos se realizó tanto a nivel histológico, mediante microscopía de inmunofluorescencia, como a nivel de ARN. Para ello, las biopsias frescas de ganglios eran divididas en dos porciones utilizando un bisturí y cada una de ellas era procesada según el análisis a realizar.

- *Ganglio linfático para inmunofluorescencia:* una porción de la biopsia de ganglio se embebía en Tissue-TEK® O.C.T.TM Compound (*Sakura Finetek, Holanda*), medio de congelación específico para la crio-preservación de tejidos. Tras una cuidadosa congelación en nitrógeno líquido, era almacenado en el mismo hasta su utilización (ver *Análisis Histológico*).
- *Suspensión celular para la obtención de células B o endoteliales:* la porción del ganglio restante se sometía a disgregación, primero mecánica, troceado y disgregación con malla de acero, y posteriormente enzimática con colagenasa (400 U/mL; Colagenasa Tipo IV, *Invitrogen*), durante 1 hora a 37°C. Las suspensiones celulares así obtenidas se incubaban con anticuerpo de ratón α -CD2, α -CD3, α -CD13 y α -CD14 para su posterior depleción con bolas Dynal, como se detalla en el apartado anterior. La suspensión celular así deplecionada era seguidamente sometida a un protocolo de selección positiva de células CD31⁺ incubándola primero con un anticuerpo monoclonal primario de ratón α -CD31 (*BD Biosciences, Anexo II, Tabla 1*) y luego con un anticuerpo secundario unido a MACS para su posterior selección positiva con AutoMACS. De este aislamiento se recogían ambas fracciones, correspondiendo la fracción positiva mayoritariamente a células endoteliales, que eran conservadas para aislamiento de su ARN, mientras que la fracción negativa era utilizada para selección positiva de células CD19 con MACS, como se detalla en un apartado anterior, y dedicadas a extracción de ARN.

3.- Cultivos con células endoteliales

3.1.- Cultivos de HUVEC

Las células endoteliales humanas de cordón umbilical (HUVEC, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, PromoCell, Heidelberg, Alemania), se cultivaban en medio de cultivo comercial (*Endothelial Cell Growth Medium*, PromoCell), hasta su utilización en los experimentos, renovándolo cada 3 días de cultivo, siguiendo las instrucciones del proveedor. Para el mantenimiento de las células en cultivo y su expansión de cara a realizar los experimentos, los cultivos se desdoblaban cuando la confluencia alcanzada en los recipientes de cultivo (*flasks*, BD Falcon, Francia) era de aproximadamente un 60%, mediante un primer lavado con PBS-EDTA (*Anexo III*) y seguido de incubación durante aproximadamente 90 segundos (observando al microscopio) en PBS-EDTA-TRIPSINA (proporción 4:1, Sigma-Aldrich, *Anexo III*), ambas soluciones atemperadas previamente a 37°C. El número máximo de estos pases fue de ocho para la utilización de las HUVEC en experimentos.

3.2.- Cultivos de EA.hy926

La línea endotelial EA.hy926 deriva de la fusión de células endoteliales HUVEC con la línea A549 estable de carcinoma de pulmón (*Edgell y cols., 1983*). Esta línea es frecuentemente usada como modelo endotelial, puesto que mantiene varias propiedades de sus progenitoras endoteliales, como la expresión de CD31, aunque no todas ellas (*Lidington y cols., 1999*), presentando por ejemplo un patrón diferencial en la expresión de integrinas en relación a HUVEC (*Baranska y cols., 2005*). La línea fue amablemente donada por el Dr. Cora-Jean S. Edgell (Universidad de Carolina del Norte, USA) y se cultivó en condiciones estándar con medio RPMI-Completo (*Anexo III*) en incubador.

4.- Análisis de Expresión de Eph/EFN mediante RT-PCR

4.1.- Aislamiento de ARN

La extracción de ARN total se realizaba tras el aislamiento de las poblaciones celulares de interés, como se detalla anteriormente, lisando éstas en *Tri-Reagent*

(Sigma-Aldrich), según las recomendaciones del fabricante. La cantidad y calidad del ARN extraído se valoraba mediante lectura de absorbancias a 260 nm y a 280 nm de longitud de onda, A₂₆₀ y A₂₈₀ respectivamente, (SmartSpecTM3000, Bio-Rad, Barcelona España). En todos los casos, se consideró un valor óptimo de calidad de ARN (A₂₆₀/A₂₈₀) de 1,8-2.

4.2.- RT-PCR

Para la obtención de cDNA, las reacciones de transcripción inversa se realizaban con el kit *SuperScript III RT* (Invitrogen), partiendo de 2 µg de ARN total en un termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

A partir de las secuencias disponibles en el *Genbank* para las moléculas de interés, se diseñaron las parejas de cebadores (*Anexo IV*) utilizadas en este estudio (programa *Primer 3*, <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), que fueron sintetizadas por *Sigma-Genosys* (*Sigma-Genosys Ltd, Cambridgeshire, Reino Unido*). En todos los casos, las parejas de cebadores utilizados se localizaron en distintos exones, por lo que una posible amplificación de ADN genómico o bien no era posible por tener un tamaño excesivamente grande para su amplificación en las condiciones de PCR utilizadas, o bien podía ser claramente discriminado del producto esperado por su mayor tamaño.

Las reacciones de amplificación por PCR se realizaban utilizando la polimerasa *AmpliTaqGold* (*Applied Biosystems, Foster City, California, Estados Unidos*) siguiendo las recomendaciones del fabricante, en un termociclador con gradiente de temperaturas (*Mastercycler gradient, Eppendorf*), en las siguientes condiciones de reacción:

- Activación inicial de la polimerasa *AmpliTaqGold*: 93°C durante 5 minutos.
- 40 ciclos que comprenden:
 - ✓ 15 segundos de desnaturalización a 94°C.
 - ✓ 30 segundos de hibridación a 58°C.
 - ✓ 30 segundos de extensión a 72°C.

- Extensión final, 10 minutos a 72°C.

Los productos de PCR se separaban por electroforesis de penetrabilidad en geles de agarosa (MB Agarose, *Biotoools, Madrid, España*) al 1,2 % (peso/volumen) en TAE 1X (*Anexo III*), utilizando un marcador de peso molecular para determinar el tamaño de las bandas (*Marker VIII, Roche Diagnostics, Alemania*). La visualización de las bandas se realizaba mediante tinción de los geles con bromuro de etidio (*Sigma-Aldrich*) y las imágenes de los mismos se obtenían en un sistema trans-iluminador con luz UV y cámara digital (*Gel-Doc, Bio-Rad, Barcelona, España*). La cuantificación de bandas se realizaba mediante programa informático (*Quantity One, Bio-Rad*).

4.3.- PCR cuantitativa a tiempo real (Q-RT-PCR)

Para la determinación por PCR cuantitativa (Q-RT-PCR) del contenido de ARNm de las dos isoformas de EFNA4, ZAP-70 o β -actina, ésta última como gen de control interno (*housekeeping*), se diseñaron parejas de cebadores óptimas para este tipo de aproximación, evaluándose las curvas de disociación de varias parejas con el fin de utilizar las óptimas (*Anexo IV*). Para la detección de estas amplificaciones se usó *Power SyBR Green PCR Mastermix (Applied Biosystems)*, placas *MicroAmp (Applied Biosystems)* con tapa (*Optical Caps, Applied Biosystems*) y termociclador *AbiPrism-7700 (Applied Biosystems)* (Unidad de Genómica del Campus Moncloa, Parque Científico de Madrid). El análisis del valor C_T (ciclo umbral o *Cycle Threshold*) de las reacciones se realizó con el programa informático *AbiPrism software (Applied Biosystems)*, disponible en la Unidad de Genómica del Campus Moncloa (Parque Científico de Madrid).

Los valores de Q-PCR-RT para las distintas muestras se expresaban bien como valor ΔC_T ($C_{T \text{ GEN PROBLEMA}} - C_{T \beta\text{-ACTINA}}$) y comparación entre las distintas muestras o mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ utilizando como calibrador linfocitos B sanos, donde $\Delta\Delta C_T$ se define como:

$$\begin{aligned} \Delta\Delta C_T &= \Delta C_{T, \text{ PROBLEMA}} - \Delta C_{T, \text{ CALIBRADOR}} \\ \left\{ \begin{array}{l} \Delta C_{T, \text{ PROBLEMA}} = C_{T, \text{ PROBLEMA}} - C_{T, \text{ S. REFERENCIA}} \\ \Delta C_{T, \text{ CALIBRADOR}} = C_{T, \text{ CALIBRADOR}} - C_{T, \text{ S. REFERENCIA}} \end{array} \right. \end{aligned}$$

5.- Clonación y secuenciación de productos PCR EFNA4.

Los productos de amplificación por PCR para EFNA4 fueron clonados en plásmidos para la transformación bacteriana usando el *kit de clonación TOPO-TA (Invitrogen)*. Las secuencias de nucleótidos se determinaron mediante secuenciación de bases en *AbiPrism-3730 (Applied Biosystems)* (Unidad de Genómica del Campus Moncloa, Parque Científico de Madrid).

6.- Electroforesis SDS-PAGE y Western Blot

La cantidad de proteína presente en los sueros de pacientes o sanos, previamente deplecionado de albúmina (*SwellGel, Pierce*), se determinó mediante el método Bradford para cargar en los geles de 20-40 µg de proteína total. Las muestras desnaturalizadas, fueron sometidas a una electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*), en condiciones desnaturalizantes, utilizando el detergente iónico dodecilsulfato sódico (SDS, *Sodium Dodecyl Sulfate*). Las proteínas se transfirieron a membranas PVDF (*Immobilon-P membranes, Millipore*), para posterior inmunodetección de EFNA4 con el anticuerpo α-EFNA4-b (*R&D Systems, Oxon, Reino Unido; Anexo II, Tabla 3*) y SAV unida a peroxidasa (SAV-HRPO; *Jackson-ImmunoResearch Europe, Suffolk, Reino Unido*). Para el revelado de bandas, se empleó el sustrato quimio-luminiscente *ECL Plus reagent (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido)* y película radiográfica de alta sensibilidad (*Kodak, Madrid, España*). La película expuesta se digitalizó con un escáner plano (*HewlettPackard, California, Estados Unidos*), para su posterior análisis.

7.- Cuantificación de EFNA4 en suero de pacientes mediante ELISA

La cuantificación de EFNA4 en el suero de pacientes y de donantes sanos, se abordó mediante ensayos ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) tipo sándwich. Para ello, los pocillos de las placas para ELISA utilizadas, *MaxiSorp Nunc-Immunoplates (Nunc, Nueva York, Estados Unidos)* se incubaron con 100 µL de PBS conteniendo 2 µg/mL del anticuerpo de captura α-EFNA4 (*R&D Systems, Anexo II, Tabla 3*) durante 2 horas a 37°C. Las muestras se diluyeron ½ y ¼ en tampón de incubación y se añadieron a los pocillos durante 2 horas a 37°C. Posteriormente, las placas adecuadamente lavadas, se incubaron con el anticuerpo de

detección α -EFNA4-b (1 $\mu\text{g/mL}$). Finalmente las placas se incubaron con SAV-HRPO (*Jackson-ImmunoResearch Europe*) (0,5 $\mu\text{g/mL}$). El revelado de la actividad peroxidasa se realizó con el sistema ABTS como sustrato y las lecturas se realizaron a longitud de onda dual 492 nm, para la detección del producto, y 405 nm en un lector de placas para ELISA (*Bio-Tek Instruments, Alemania*).

Para el cálculo de la recta patrón, se utilizó como estándar la proteína recombinante humana EFNA4-Fc (*R&D Systems, Anexo II, Tabla 4*), partiendo de una concentración máxima de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ y hasta 8 diluciones seriadas, suponiendo cada una de ellas $\frac{1}{4}$ de la anterior. A partir de la curva patrón obtenida, se determinaron las concentraciones de EFNA4 en las muestras problema (ng/mL).

8.- Análisis inmunofenotípico y de unión de proteínas recombinantes mediante citometría de flujo

Las tinciones con anticuerpo y la unión de proteínas recombinantes se realizaron en tampón PBS-FACS (*Anexo III*), utilizando un número de células de 2 ó 3 $\times 10^5$ células en 50 μL de PBS-FACS. Los lavados, igualmente en PBS-FACS, se realizaron centrifugando las muestras durante 5 minutos a 1.200 revoluciones por minuto (rpm) en una centrífuga (MULTIFUGE 3 S_R, Heraeus) o durante 7 minutos a 6.500 rpm en una microfuga (*Biofuge fresco, Heraeus, Madrid, España*), dependiendo del tipo de tubo muestra utilizado para las incubaciones.

La adquisición de muestras se realizó en un citómetro de flujo FACS_{CALIBUR} (*Fluorescence-Activated Cell Sorting; BD Immunocytometry systems, California, Estados Unidos*), equipado con dos láseres de 488 nm y 630 nm y cuatro detectores de fluorescencia, o un FACScan (*BD Immunocytometry systems*) equipado con un láser 488 nm y tres detectores de fluorescencia, ambos del Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la UCM. La adquisición de muestras y el análisis de datos mediante citometría de flujo se realizó con los programas *CellQuest* o *CellQuest-Pro* (*BD Immunocytometry systems*).

8.1.- Tinciones con anticuerpos

Las tinciones con anticuerpos fueron directas, utilizando anticuerpos directamente conjugados a fluorocromo (*Anexo II, Tabla 1*), o indirectas, utilizando anticuerpos primarios no unidos a fluorocromo (*Anexo II, Tablas 2-3*). En todos los casos, se utilizaron cantidades saturantes de anticuerpo, recomendadas por los fabricantes o evaluadas en el laboratorio. En el caso de tinciones indirectas, tras incubación con el anticuerpo primario correspondiente, éste se detectaba con anticuerpos secundarios especie-específicos unidos a fluorocromo (*Anexo II, Tabla 5*) o SAV unida a fluorocromo (*Anexo II, Tabla 5*), en el caso de anticuerpos primarios unidos a biotina. En los casos en que la tinción incluía, tanto marcaje directo como marcaje indirecto en la misma muestra, siempre se realizaba en primer lugar el indirecto.

Por otra parte, algunas de las tinciones con anticuerpos se realizaban para detectar proteínas intracelulares o frente a dominios intracelulares, por lo que las muestras requerían ser permeabilizadas. En estos casos, primero se realizaban las tinciones de la superficie celular, como las descritas anteriormente, y posteriormente las células se fijaban en solución comercial, *Cytofix/Cytoperm* (*BD Biosciences*), conteniendo 4% paraformaldehído durante 20 minutos a 4°C. Para realizar la tinción intracelular, los anticuerpos se añadían a las células en tampón comercial conteniendo saponina como agente permeabilizante (*PermWash, BD Biosciences*). Finalmente, las células eran resuspendidas en tampón PBS-FACS para su análisis por citometría de flujo.

8.2.- Unión de proteínas recombinantes EphA2-Fc y EFNA4-Fc

Las células a evaluar se pre-incubaban con fragmentos Fc de IgG humana (h-Fc, *Jackson-ImmunoResearch Europe*), 0,2 µg/10⁶ células, durante 10 minutos a 4°C, para bloquear la unión de las proteínas recombinantes a las células por su dominio Fc. Las proteínas recombinantes (*R&D Systems; Anexo II, Tabla 4*), las cuales se describen detalladamente en el apartado 9.2.1, se emplearon a 0,5 µg/10⁶ células y se visualizaron gracias a la unión con α-Hist unido a fluorocromo, bien isotiocianato de fluoresceína (FITC; *AbD Serotec, Oxford, Reino Unido*) o bien ficoeritrina (PE; *R&D Systems*), empleando las cantidades recomendadas por el fabricante en cada caso.

9.- Cultivos celulares

9.1.- Cultivos de linfocitos B sanos y estimulación

Linfocitos B sanos enriquecidos según el *apartado 2.1.2*, se cultivaban en medio RPMI-Completo (*Anexo III*) durante 3 días en incubador (37°C, 5% de CO₂ en aire y humedad). Los tratamientos de estimulación consistían en suplementar al medio de cultivo con 0,5 µg/mL de α-IgM (Fragmentos F(ab)₂, *Jackson ImmunoResearch Europe*) ó 1 µg/mL de LPS (lipopolisacáridos; *Sigma-Aldrich*) adaptando los protocolos publicados anteriormente (*J.J. Mond & M. Brunswick, Current Protocols in Immunology, UNIT 3.10*). Transcurrido el tiempo pautado la totalidad de la muestra se recogía mediante diversos lavados con PBS-EDTA a 37°C para su posterior análisis según el caso. Cada uno de los supuestos se realizó con 6 muestras sanas.

9.2.- Ensayos funcionales y tratamientos Eph/EFN

Todos los ensayos funcionales, los cuales serán descritos a continuación, se llevaron a cabo bajo las siguientes directrices generales:

- Incubador: 37°C, 5% CO₂, humedad.
- Placas de 96 pocillos fondo plano (*BD Falcon*), a excepción de los ensayos de migración.
- El medio de cultivo utilizado fue RPMI-Experimentos (ver *Anexo III*), en un volumen de 200 µL por pocillo, a excepción de los ensayos de adhesión linfocito-endotelio y análisis de conjugados, que eran realizados en 30 µL.
- La evaluación de los ensayos por citometría de flujo se realizó en un FACS_{CALIBUR}, a intensidad de flujo medio, durante un tiempo fijo y su posterior análisis con el programa *FCS Express V3*.
- Todos los supuestos se realizaron por triplicado, sin excepción.

9.2.1.- Proteínas recombinantes Eph/EFN

Las proteínas recombinantes utilizadas (*R&D Systems, Anexo II, Tabla 4*) consistían en homodímeros del dominio extracelular de interacción ligando/receptor,

un péptido de unión (IEGRMD) y una región del fragmento Fc de IgG humana. Este fragmento está fusionado a su vez con seis repeticiones de Histidina (Hist) (Figura 8 A).

El uso de estas proteínas recombinantes, tanto para citometría como para la realización de los ensayos funcionales, se realizaba previa incubación de las células con fragmentos Fc de IgG humana (h-Fc, Jackson ImmunoResearch Europe), 0,2 $\mu\text{g}/10^6$ células, durante 10 minutos a 4°C, con el fin de bloquear la unión de las proteínas recombinantes a las células por su dominio Fc.

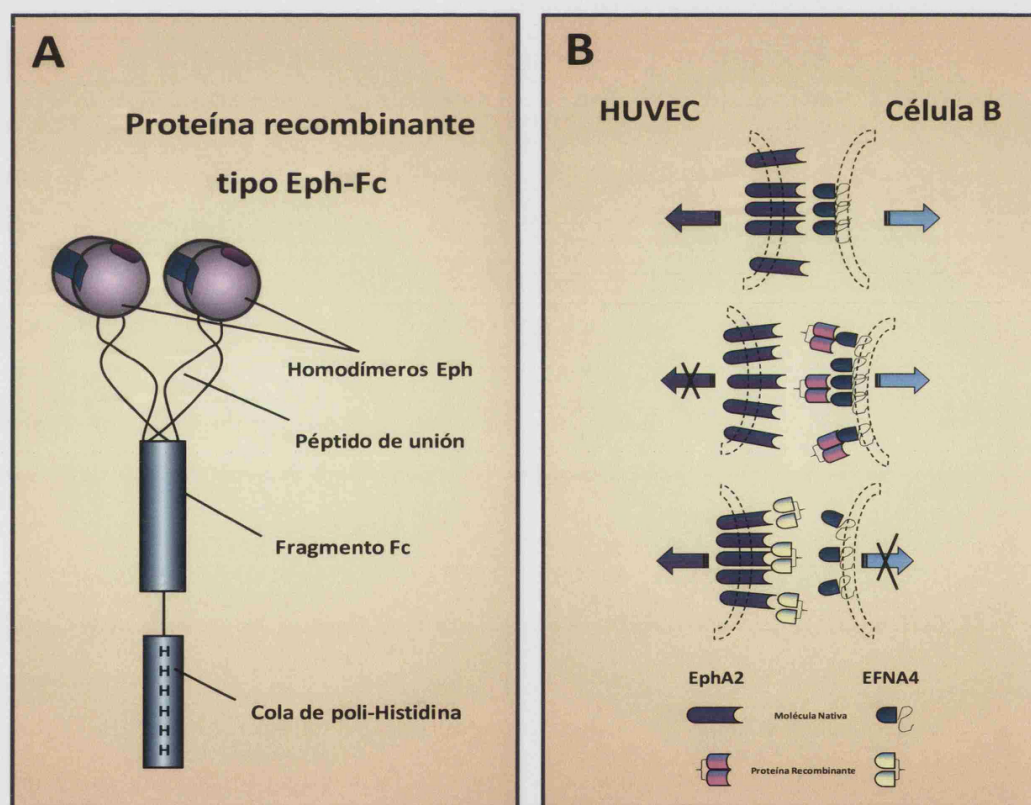


Figura 8. Representación gráfica de una molécula recombinante Eph. A) Los homodímeros, que determinan el tipo receptor contienen zonas de unión a EFN. IEGRMD es el péptido de unión. El fragmento Fc pertenece a una IgG₁. La cola de Histidina consta de seis repeticiones. La recombinante EFNA4-Fc, responde a la misma estructura, con los correspondiente homodímeros con zonas de unión al receptor. B) Al suministrar las proteínas recombinantes, EphA2-Fc y EFNA4-Fc, separadamente sobre la población correspondiente, estamos bloqueando la señal intrínseca y posiblemente impidiendo que se produzca señalización a través de la molécula nativa.

Las proteínas se utilizaban a concentración saturante de $0,5 \mu\text{g}/10^6$ células, determinado por citometría de flujo. En los casos en que las proteínas eran suministradas en forma pre-agregada, valiéndonos de sus características, se incubaron con cantidades equimoleculares de α -poli-Hist-b (*R&D Systems; Anexo II, Tabla 6*), $0,5 \mu\text{g}/10^6$ células y, en algún caso, SAV ($0,2 \mu\text{g}/10^6$ células) (*Jackson-ImmunoResearch Europe; Anexo II, Tabla 5*). La formación de complejos se realizaba durante 30 minutos en frío, con la mezcla de proteínas indicadas en PBS. Los tratamientos con proteínas recombinantes EFNA4-Fc o EphA2-Fc sobre endotelios o células B, respectivamente, se realizaron siempre pre-incubando las poblaciones celulares separadamente ($0,5 \mu\text{g}/10^6$ células) y retirando la proteína no pegada previo al co-cultivo. El posible efecto de esta aglutinación se representa en la *Figura 8 B*.

9.2.2.- Ensayos de trans migración en monocapas de HUVEC

Las HUVEC eran sembradas en placas de cultivo 96 pocillos y, tras alcanzar confluencia, eran tratadas con TNF- α (10 ng/mL) durante toda una noche, siendo retirado al menos dos horas antes del co-cultivo. Las células B, tanto sanas como leucémicas, eran teñidas previamente al co-cultivo, con el colorante fluorescente CFSE (Carboxi-Fluorescein-Succinilmidil-Éster; *Molecular Probes, Invitrogen*) en solución PBS 2 μM CFSE, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. La incorporación de este colorante fluorescente en las células B permitía su identificación posterior mediante citometría de flujo. El co-cultivo se mantenía en incubador (37°C, 5% CO₂) durante 2 horas, tras lo cual se recuperaban las células en lavados diferenciales atendiendo a su grado de adhesión al endotelio. Mediante un primer lavado, suave pero exhaustivo, con medio RPMI previamente atemperado a 37°C, se recogía la fracción de células que no se habían adherido a la monocapa, o cuya adhesión había sido más débil. A esta fracción se le denominó F1. El siguiente lavado se realizaba con PBS-EDTA a 37°C, dejando actuar durante 7 minutos a este quelante de calcio, lo que provocaba que en esta segunda fracción, F2, pudieran recuperarse mayoritariamente las células B que estaban fuertemente unidas a la monocapa. Finalmente, se realizaba un último lavado en medio RPMI-EDTA-TRIPSINA (*Sigma-Aldrich; ver Anexo III*), dejando actuar a esta enzima durante 10 minutos, permitiendo recoger en esta última fracción, denominada F3, las células endoteliales

junto con las células B que hubieran migrado a través de la monocapa. Tras este último lavado se examinaba la placa de ensayo al microscopio, para asegurar que ambos tipos celulares habían sido recogidos en su totalidad.

9.2.3.- Ensayos de adhesión linfocito-endotelio

Monocapas de HUVEC en cultivo se estimulaban con 10 ng/mL de TNF- α (PeproTech, Nueva York, Estados Unidos) durante la noche, tras lo cual se reponían los cultivos con medio fresco sin TNF durante 2 horas, y se procedía a levantarlas con PBS-EDTA atemperado a 37°C. A continuación, las suspensiones celulares de HUVEC se teñían con el colorante fluorescente PKH26 (*Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit, for General Cell Membrane Labelling; Sigma-Aldrich*) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. La fluorescencia emitida se recogía en el canal FL-2H de los citómetros utilizados.

Los linfocitos B, tanto sanos como leucémicos, eran teñidos previamente con CFSE (2 μ M), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante, pudiendo identificar su fluorescencia en el canal FL-1H de los citómetros utilizados.

Una vez teñidos ambos tipos celulares, se procedía a su co-cultivo mezclándolos en una proporción de 5×10^4 HUVEC y 2×10^5 células B por pocillo en un volumen de medio de 30 μ L, y se mantenían durante 60 minutos en agitación constante, para maximizar el contacto entre ambos tipos celulares. Transcurrido el co-cultivo, se añadía solución fijadora (*CellFix, BD Biosciences*), con el fin de que los complejos celulares linfocito-endotelio (conjugados) formados durante el co-cultivo se mantuvieran estables hasta su análisis por citometría de flujo.

El análisis de estos conjugados celulares se realizó mediante citometría de flujo, como se muestra en la *Figura 9*. En una representación biparamétrica, FL-1H *versus* FL-2H, se acotaba la población CFSE⁺ total y, posteriormente, se determinaba en la misma la proporción de la población PKH26⁺ (*Figura 9*), que debía corresponder a los

conjugados celulares. Estos ensayos se realizaron con 13 muestras B-LLC y con 3 muestras B-SP.

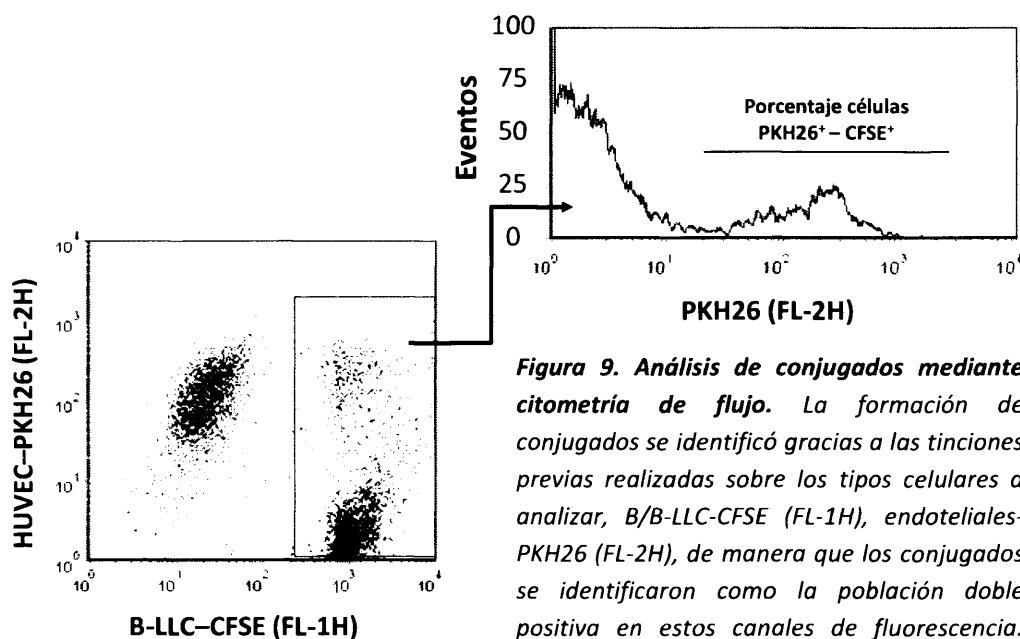


Figura 9. Análisis de conjugados mediante citometría de flujo. La formación de conjugados se identificó gracias a las tinciones previas realizadas sobre los tipos celulares a analizar, B/B-LLC-CFSE (FL-1H), endoteliales-PKH26 (FL-2H), de manera que los conjugados se identificaron como la población doble positiva en estos canales de fluorescencia.

Acotada una primera región en FSC y SSC, se analizaron los canales de fluorescencia de interés, con el fin de acotar una nueva región que comprendiera las células que presentaran una alta intensidad de fluorescencia para FL-1H. A partir de esta nueva región, se identificó el porcentaje de células que, además, presentaran una alta intensidad de fluorescencia en FL-2H. Se muestra un experimento representativo realizado con B-LLC y HUVEC.

9.2.4.- Ensayos de adhesión de células B a moléculas de la matriz extracelular (MEC) o moléculas de adhesión (CAM)

Los pocillos de placas de cultivo se pre-incubaron con 100 μ L de PBS conteniendo 10 μ g/mL de moléculas de matriz extracelular: FibroNectina (FN, *Sigma-Aldrich*), VitroNectina (VN, *BD Biosciences*), LaMinina (LM, *Sigma-Aldrich*), CoLágeno-I (CL-I, *Sigma-Aldrich*) y Ácido Hialurónico (AH, *R&D Systems*), o las moléculas de adhesión rh-ICAM-1 ó rh-VCAM-1 (ambas de *R&D Systems*), a 37°C durante 2 horas. Finalmente, los pocillos eran lavados con PBS a 37°C, para posteriormente añadir 5×10^5 células B, leucémicas o sanas, y se mantenían en cultivo durante 2 horas en incubador (5% CO₂, 37°C), tras lo cual se agitaban las placas y se recogían las células no adheridas.

El recuento de las células recuperadas se determinaba mediante citometría de flujo, usando como herramienta de conteo, *CountBright™ Absolute Counting Bead* (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Estas microesferas fluorescentes presentan unas características de tamaño-complejidad muy diferentes de las de las células B de interés, gracias a lo cual se pueden discriminar ambas por citometría de flujo (Figura 10). Añadiendo a cada pocillo a evaluar un número conocido de micro-esferas, se puede cuantificar la cantidad de linfocitos B recuperados, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Nº de linfocitos B no adheridos} = \frac{\text{Nº de B visualizados} \times \text{Nº de micro-esferas añadidas}}{\text{Nº de microesferas visualizadas}}$$

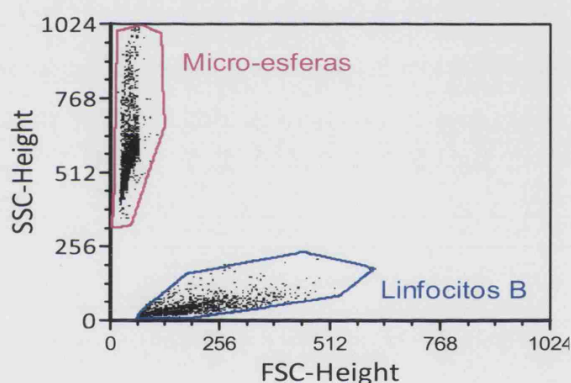


Figura 10.
Discriminación de
microesferas y
células B por
citometría de flujo
atendiendo a
tamaño (FSC) y
complejidad (SSC).

9.2.5.- Ensayos de migración en respuesta a gradientes de quimiocinas (quimiotaxis)

Los ensayos de quimiotaxis se llevaron a cabo en placas *Transwell Insert Plates* (Costar, Corning) con formato de 96 pocillos y filtros con tamaño de poro de 5 µm de diámetro. Estos ensayos se realizaron, tanto en presencia como en ausencia de monocapa de HUVEC pre-tratada con TNF-α (10 ng/mL, durante la noche). Un total de 5×10^5 células B, sanas o leucémicas, pre-teñidas con CFSE (2 µM) eran añadidas al compartimento superior de los pocillos, mientras que en la parte inferior se añadían las distintas quimiocinas recombinantes (*Peprotech*): CCL19 (500 ng/mL), CXCL12 (100 ng/mL) y CXCL13 (1000 ng/mL). Las placas se centrifugaban levemente (5 segundos, 200 g.) y se mantenían en cultivo en incubador durante 2 horas. Las células B migradas al compartimento inferior de los pocillos se recogían en PBS-EDTA. El

número de células migradas se determinaba mediante recuento por citometría de flujo y microesferas (ver apartado anterior).

9.2.6.- Ensayos de supervivencia de células B en presencia de células endoteliales

Monocapas de HUVEC en cultivo eran tratadas o no con TNF- α (10 ng/mL) durante la noche en medio para HUVEC y mantenidas en incubador. Seguidamente, los cultivos se reponían con medio RPMI-1% FCS sin citocina hasta la adición de las células B. Un grupo de cultivos se fijaban con solución formaldehído 4% comercial (*Cellfix*) durante 15 minutos en incubador, tras lo cual se retiraba el fijador y se lavaban repetidamente con PBS 1X y, finalmente, en medio RPMI-Experimento donde se mantenían hasta su utilización en los co-cultivos. Para todos estos supuestos, se añadían $2,5 \times 10^5$ células B en medio RPMI-Experimento, cultivándose durante distintos tiempos como se detalla en Resultados. En algunos supuestos, se añadía a los co-cultivos las moléculas de adhesión recombinantes rhICAM-1 ó rhVCAM-1 (*R&D Systems*), 0,1 μ g por pocillo, y/o rhEphA2-Fc o rhEFNA4-Fc, como se indicaba en el apartado 9.2.1.

Para la determinación por citometría de flujo de la supervivencia y apoptosis de las células B en estos cultivos, las células eran recuperadas de los pocillos de cultivos en su totalidad, tratando los pocillos con PBS-EDTA-TRIPSINA, en los cultivos con HUVEC vivas, o PBS-EDTA en los cultivos con HUVEC fijadas. Las suspensiones celulares se incubaban durante 1 hora en una solución tampón HEPES especial para tinción con Anexina-V (Tampón Anexina, *Anexo III*) conteniendo Anexina-V-PE (0,2 μ L/pocillo; *BD Biosciences*) y α -CD19-FITC (*Anexo II, Tabla 1*). Finalmente, se añadía el colorante fluorescente intercalante de ADN 7-AAD (1 μ g/mL) durante 15 minutos a temperatura ambiente (*BD Biosciences*). Las muestras se adquirirían en un citómetro de flujo y las poblaciones vivas y apoptóticas se acotaban como se muestra en la *Figura 11*, tras acotar la población CD19⁺.

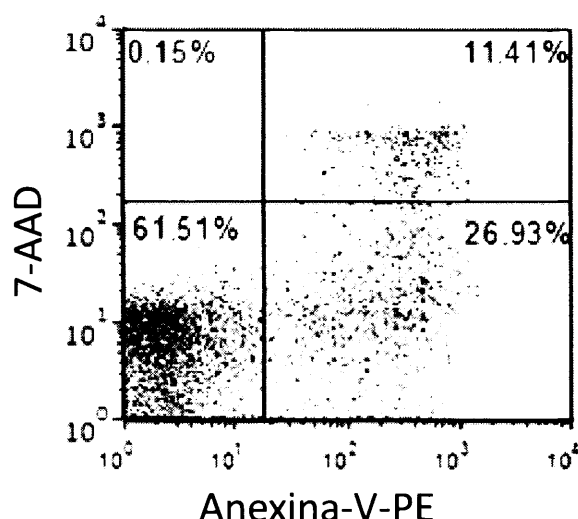


Figura 11. Análisis por citometría de flujo de las poblaciones vivas y apoptóticas tempranas mediante tinción con Anexina-V-PE y 7-AAD. Las células vivas se acotaban en el cuadrante inferior izquierdo y las células apoptóticas tempranas, en el cuadrante inferior derecho. Las células necróticas, en el cuadrante superior derecho.

10.- Microscopía Confocal

10.1.- Adquisición y análisis de imágenes

Las imágenes de fluorescencia fueron adquiridas en un microscopio confocal espectral (TCS-SP2 AOBS, Leica,) acoplado a un microscopio motorizado invertido (IRE-2, Leica). La adquisición del escaneo secuencial fue llevada a cabo por *line-averaging* (X8) y acumulada por *frame* (X2) a una resolución de 1024 X 1024 píxeles, en una habitación a 22°C en oscuridad. Los programas informáticos utilizados para tratamiento y análisis de imágenes fueron: para el análisis cuantitativo de imagen: *Leica Confocal Software, LCS*. (Leica Microsystems Corp.), *Metamorph 7.0* (Universal Imaging, Inc.) e *Image-J*, para randerización 3D, deconvolución y filtrado: *Image Surfer*, *Paraview* e *ImageJ*.; y para maquetado de figuras: *Adobe Photoshop CS2*.

10.2.- Inmunofluorescencias en ganglios linfáticos

De los ganglios linfáticos almacenados en N₂ líquido, se obtenían secciones de 8 µm a -24°C, en criostato (*Leica 1850, Heidelberg, Alemania*). Las secciones se dejaban secar al aire durante toda una noche y se fijaban a temperatura ambiente durante 10 minutos en acetona (*Panreac S.A., Barcelona, España*). Las secciones se pre-hidratában en PBS-BSA (*Anexo III*), previo a realizar las inmunofluorescencias. Las incubaciones con anticuerpos se realizaban en cámara húmeda, 30 minutos, añadiendo a cada sección 50

μL de solución PBS-BSA conteniendo 0,1 μg/mL del anticuerpo correspondiente. Los lavados entre incubaciones se realizaban en PBS-BSA (5 minutos, 3 cambios). Al finalizar las inmunofluorescencias, las preparaciones se montaban en medio Prolong Gold (Invitrogen) y cubreobjetos de vidrio de 0,14 mm de espesor.

Las secciones primero se incubaban con los anticuerpos primarios α-EphA2, α-EphA3, α-EphA4 (hechos en conejo; *Santa Cruz Biotechnology, California, Estados Unidos; Anexo II, Tabla 3*) o α-EphA8 (hecho en cabra; *R&D Systems, Anexo II, Tabla 3*). Tras ser lavados, se incubaban con anticuerpos secundarios unidos a Alexa-Fluor®546 (*Anexo II, Tabla 5*) hechos en burro y especie específicos α-conejo o α-cabra, según el caso. Seguidamente, las preparaciones se incubaban con α-CD19 (hecho en ratón; *BD Biosciences, Anexo II, Tabla 2*), seguido de un secundario α-ratón conjugado con Alexa-Fluor®488 (*Anexo II, Tabla 5*). Finalmente, se incubaban con α-CD31-Alexa-Fluor®647 (*Anexo II, Tabla 1*).

Las inmunofluorescencias para ki-67 o CD3 (ambos ratón-IgG-α-humano; *BD Biosciences, Anexo II, Tabla 2*) se revelaban con anticuerpo secundario unido a Alexa-Fluor®488, y se combinaban con tinciones frente a α-EphA4, reveladas con un anticuerpo secundario Alexa-Fluor®546, y finalmente α-CD19-FITC.

En todos los casos, los núcleos celulares se tiñeron con *Hoechst 33342 (Invitrogen)*.

10.3.- Ensayos de co-localización y agregación de EphA2 sobre HUVEC

Para la realización de estos ensayos y su posterior observación, las HUVEC se crecieron sobre portaobjetos de vidrio de 16 pocillos (*Lab-Tek Chamber Slide™, Nunc*), pretratados con fibronectina (10 μg/mL) durante al menos 1 hora.

10.3.1.- Co-localización de EphA2 y EphA4 con EFNA4-Fc

Formas pre-agregadas de EFNA4 (EFNA4-Fc + α -Hist-b + SAV-Alexa-Fluor®405 o SAV-Alexa-Fluor®488, ver *Anexo II, Tabla 5*) se añadían a los cultivos de HUVEC pre-estimuladas con TNF- α (10 ng/mL). Posteriormente, los cultivos se fijaban en PF4% y se realizaba la inmunodetección con anticuerpos α -EphA2 o α -EphA4, revelados con α -conejo-fluorocromo (según el caso). Para visualizar la co-localización de EFNA4-Fc y EphA2 ó EphA4, se crearon gráficos bi-paramétricos de fluorescencia (LCS, Leica). La co-localización se hizo evidente en *Regiones de Interés* (ROI, *Region Of Interest*).

10.3.2.- Distribución topológica de EFNA4-Fc

La monocapa de HUVEC era estimulada con TNF- α (10 ng/mL) la noche previa al ensayo. Tras esta estimulación la monocapa se trataba con la forma pre-agregada de EFNA4 (EFNA4-Fc + α -Histidina-b + SAV-Alexa-Fluor®405, *Anexo II, Tablas 4, 5 y 6*) fijándolas con PF4% tras 15, 30 ó 60 minutos de incubación. La adquisición de imágenes seriadas en Z (con un paso de 0,1 μ m, objetivo de inmersión en aceite, 63X) se realizaba desde la zona más apical a la basal de la monocapa. Las imágenes seriadas en Z de las proyecciones en pseudo-color fueron creadas para determinar la distribución topológica de los puntos de EFNA4 para cada tiempo. Para evaluar estos puntos de fluorescencia las imágenes fueron segmentadas y analizadas (*Metamorph 7.1, Molecular Devices*) de acuerdo al umbral establecido en la escala de pseudocolor.

10.3.3.- Distribución de EphA2 respecto a ICAM-1 y VCAM-1 tras el tratamiento con EFNA4-Fc

La monocapa endotelial se trató con 2,5 μ g/mL de EFNA4 (EFNA4-Fc + α -Histidina-b + SAV-Alexa-Fluor®405, *Anexo II, Tablas 4, 5 y 6*). Tras 15, 30 ó 60 minutos de cultivo, las células se fijaban para posteriormente realizar la inmunofluorescencia de EphA2 (conejo- α -EphA2 + α -conejo-Alexa-Fluor®546) respecto a la de ICAM-1 (ratón- α -ICAM-1 + α -ratón-Alexa-Fluor®488) o a la de

VCAM-1 (ratón- α -VCAM-1 + α -ratón-Alexa-Fluor®633). La co-localización se determinó como se describe en el apartado anterior.

10.3.4.- Distribución de ICAM-1 respecto a EphA2 y VCAM-1 tras el tratamiento con α -ICAM-1

La monocapa de HUVEC pre-estimulada con TNF- α , se trataba con un anticuerpo α -ICAM-1 (ratón- α -ICAM-1 + α -ratón-Alexa-Fluor®488) durante 15, 30 ó 60 minutos, de forma análoga al apartado anterior. La distribución de ICAM-1 se analizó frente a la de EphA2 (conejo- α -EphA2 + α -conejo-Alexa-Fluor®546) y la de VCAM-1 (ratón- α -VCAM-1 + α -ratón-Alexa-Fluor®633). La co-localización se determinó como se describe en el *punto 10.3.1*.

10.4.- Interacción linfocitos-endotelio

Las células B-LLC-SP y las B-SP eran co-cultivadas con la monocapa de HUVEC, previamente estimuladas con TNF- α , durante 2 horas. Las células no adheridas eran retiradas mediante diversos lavados con RPMI-Experimento a 37°C, en el cual se llevaba a cabo el ensayo. Los cultivos eran lavados y posteriormente fijados (*Cytofix*, BD Biosciences) antes de realizar la inmunodetección para EphA2 (α -EphA2 + α -conejo-Alexa-Fluor®546) e ICAM-1 (α -ICAM-1 + α -ratón-Alexa-Fluor®488). Los núcleos celulares se teñían con *Hoechst 33342* (Invitrogen), usando las recomendaciones del fabricante.

11.- Análisis Estadístico

Todos los experimentos eran realizados en triplicado para cada una de las muestras analizadas. Las pruebas estadísticas realizadas se describen en cada uno de los apartados correspondientes. Los análisis estadísticos para un alto número de variables y muestras se realizaron en *IBM SPSS Statistics* (tablas de contingencia y test χ^2 (*Chi-cuadrado*) con corrección exacta de Fisher, análisis de conglomerados aglomerativos, análisis de correlación). La significación estadística de experimentos se valoró mediante el estadístico *T-Student*, para muestras pareadas o no pareadas, según el caso, con una o dos colas de distribución, y los análisis de regresión simple, para determinar la correlación entre variables

continuas, se realizaron en *StatGraphics Centurion XVI* o *Microsoft Office Excel*. Las diferencias significativas se representan en base al valor de su significación estadística (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; y *** $p < 0,005$). Las representaciones gráficas de valores se realizaron en *Microsoft Office Excel 2007* o *StatGraphics Centurion XVI*.

Resultados

Al comienzo de nuestro estudio, los datos publicados en relación con la expresión de Eph/EFN en linfocitos B humanos eran más bien escasos (*Aasheim y cols., 1997; Inada y cols., 1997*) e inexistentes en relación con la LLC. Tan sólo se había descrito la expresión de dos isoformas de EFNA4 en linfocitos B humanos (*Aasheim y cols., 2000*) pero no se habían relacionado con su función. Por otra parte, algunos estudios habían puesto de manifiesto la expresión de ciertos miembros de esta familia en líneas celulares leucémicas (*Wicks y cols., 1992; Steube y cols., 1999*), pero en cualquier caso no existía una caracterización más o menos concluyente de su expresión en linfocitos B sanos ni en leucemias ni en linfomas. Por consiguiente, era necesario abordar este estudio, tanto desde la perspectiva de la enfermedad como de la condición sana.

1.- Caracterización de la expresión de Eph/EFN en B-LLC y B sanas y su posible correlación con la clínica de esta enfermedad

1.1.- Análisis comparativo de la expresión de Eph/EFN en células B-LLC y B sanas, procedentes de sangre periférica o tejidos linfoides (linfadenopatías y ganglios linfáticos normales)

Células leucémicas CD19⁺CD5⁺ enriquecidas a partir de sangre periférica (SP) de 82 pacientes (B-LLC-SP) y de 2 linfadenopatías (B-LLC-GL), constituyeron nuestro grupo de estudio para la consecución de este primer objetivo, mientras que linfocitos B sanos CD19⁺ aislados a partir de SP (B-SP) de 6 donantes sanos o de 4 ganglios linfáticos (B-GL), 2 reactivos y 2 centinela, constituyeron el grupo control.

El análisis de la expresión de Eph/EFN en las distintas muestras se llevó a cabo mediante RT-PCR, utilizando parejas de cebadores específicos para cada uno de los miembros de esta familia (*Anexo IV, Tablas 1-4*), cuyas secuencias de nucleótidos habían sido previamente descritas en humanos. Mediante análisis densitométrico de geles, se determinó la presencia/ausencia de estos miembros Eph/EFN para las muestras estudiadas, cuya totalidad para B-LLC se refleja en el *Anexo V, Tabla 1*.

Los patrones de expresión de Eph/EFN encontrados en las distintas muestras analizadas, B-LLC y B sanas, procedentes de sangre periférica o ganglios linfáticos, se reflejan en la *Figura 12*, donde se indican los porcentajes de muestras que presentaron expresión para cada una de los miembros de esta familia. Al realizar un primer análisis general, comparando las expresiones encontradas en B-LLC y células B, ambas procedentes de sangre periférica, se observó una representación más amplia de miembros Eph/EFN en las B-LLC-SP que en las B-SP sanas y, entre las primeras, una alta heterogeneidad en cuanto a los patrones encontrados en las distintas muestras (*Anexo V, Tabla 1*). Al realizar un análisis más exhaustivo de los patrones de expresión, se encontró que ambos tipos de muestras presentaban en común la ausencia de expresión de EphA5 ó A7 y EFNA2, A5 ó B1 y B3, así como la presencia en todas ellas de EFNA4 (encontrada en el 100% de los B-LLC-SP y en el 100% de los B-SP). Para este último miembro, además, se detectó la presencia de dos amplicones de distinto tamaño, que fueron clonados y secuenciados, como describiremos posteriormente, con el fin de determinar su posible correspondencia con las isoformas descritas por otros autores (*Aasheim y cols., 2000*).

Expresión Eph/EFN por RT-PCR

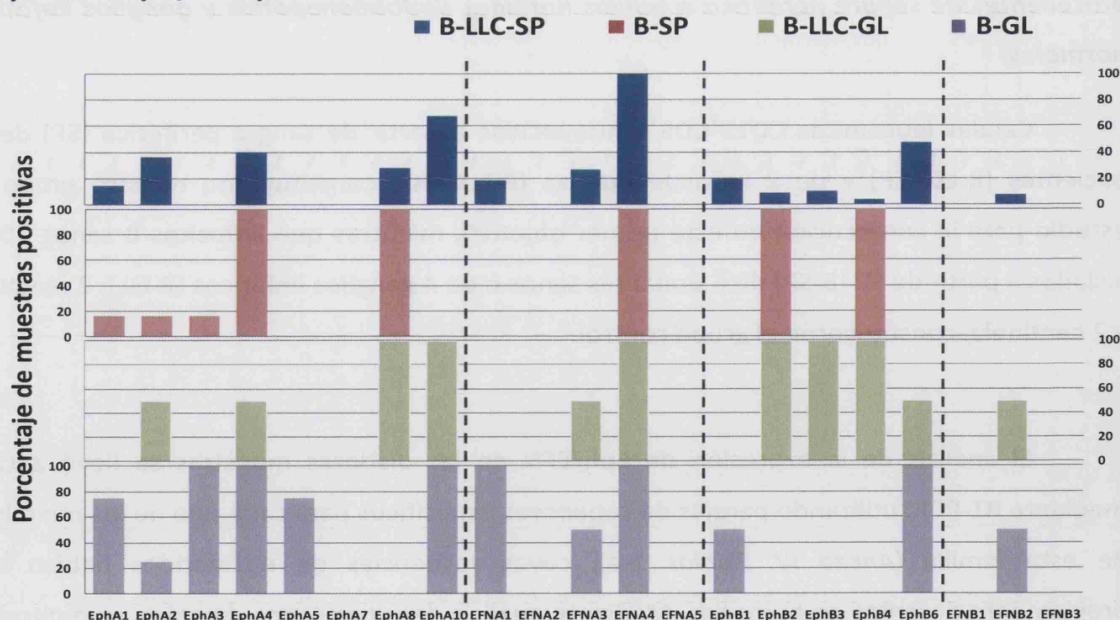


Figura 12. Perfil de expresión Eph/EFN en células B mediante RT-PCR. Células CD19⁺ fueron enriquecidas a partir de muestras de sangre periférica o ganglios de individuos sanos o con LLC. Tras la extracción de ARN total y posterior RT-PCR, se analizó la expresión de Eph/EFN mediante PCR. Los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa 1,2%, teñidos con bromuro de etidio y fueron fotografiados en un sistema transiluminador Bio-Rad. Los geles se analizaron mediante densitometría. 82 muestras B-LLC-SP, 6 muestras B-SP, 2 B-LLC-GL y 4 B-GL.

A pesar de estas coincidencias, el patrón de expresión de B-LLC-SP y B-SP difería ampliamente para el resto de Eph/EFN. El patrón de expresión en B-SP resultó bastante homogéneo, con una presencia constante (100%) de algunos receptores (EphA4, EphA8, EphB2 y EphB4) y nula de otros miembros, tanto receptores como ligandos (receptores EphA10, EphB1, EphB3 y EphB6 y ligandos EFNA1, EFNA3, EFNB2); mientras que los miembros restantes (EphA1, EphA2 y EphA3) se detectaron en un bajo porcentaje de muestras (<20%). Por el contrario, en las B-LLC-SP se encontró una baja frecuencia (<50%) de los miembros mayoritariamente presentes en B sanas [concretamente los receptores EphA4 (40%), EphA8, (30%), EphB2 (<10%), EphB4 (<5%)], una expresión diferencial de ciertos miembros no expresados por B-SP [receptores EphA10 (>60%), EphB1 (20%), EphB3 (<10%), EphB6 (50%) y ligandos EFNA1 (<20%), EFNA3 (25%) y EFNB2 (10%)] y ausencia de EphA3.

Llegados a este punto, consideramos importante determinar si los patrones Eph/EFN observados en las células circulantes podrían verse “alterados” en relación con la procedencia tisular de las células. De manera que, mediante el aislamiento de las células de interés a partir de ganglios linfoides, pudimos evaluar hasta qué grado los patrones observados en las células de sangre periférica podrían modularse según su localización tisular. Para tal fin, sólo pudimos contar con 2 adenopatías LLC y 4 ganglios control, limitando considerablemente esta aproximación.

En el caso de B sanas, la ausencia de expresión de ciertos miembros en las B-SP se confirmó en B-GL, concretamente las de EphA7, EFNA2, EFNA5, EphB3, EFNB1 y EFNB3; mientras que para otros miembros raramente expresados en B-SP (<20%), se encontraron frecuencias de expresión más altas como EphA1 (75%) y EphA3 (100%). No obstante, Bs sanos de ambas procedencias diferían claramente en sus patrones de expresión. Así, los B-GL sí expresaban EphA10, EphB6 y EFNA1 en todos los casos (100%), una más alta frecuencia de EphA5 (75%), EFNA3 (50%), EphB1 (50%) y EFNB2 (50%), mientras que no se detectó expresión de algunos de los miembros más frecuentes en circulantes como EphA8, EphB2 ó EphB4. Consiguientemente, la expresión de Eph/EFN en linfocitos B varía entre los circulantes y los localizados en ganglios, sugiriendo que el estadio madurativo y/o estado de activación podría regular la expresión de Eph/EFN, aspecto que se abordará posteriormente.

Las B-LLC procedentes de adenopatías, por el contrario, presentaban un patrón Eph/EFN muy similar al de células leucémicas circulantes en cuanto a los miembros expresados, exceptuando la ausencia de EphA1, EFNA1 y EphB1, que por otra parte fueron expresadas en baja frecuencia en estas últimas. A pesar de que se sólo se contara con dos linfadenopatías, cabe destacar la presencia en ambas de EphA8, EphA10, EphB2, EphB3, EphB4, todas ellas expresadas en B-LLC circulantes, aunque en distintas frecuencias, así como la de EphA4 y EphB6, expresadas en una de las dos adenopatías examinadas. Consiguientemente, parecía claro que la expresión de Eph/EFN en B-LLC de ambas localizaciones no sufría cambios tan importantes como los observados en B sanas sugiriendo, por tanto, que las diferencias entre muestras B-LLC de ambas procedencias podrían estar más relacionadas con la biología propia de la enfermedad.

Considerando las diferencias entre células B-SP y B-GL, analizamos comparativamente la expresión de B-LLC-SP en relación con las situaciones sanas, en busca de posibles semejanzas. Para ello, se realizó un análisis de conglomerados acumulativos de las B-LLC-SP en base a los miembros Eph/EFN expresados de forma diferencial por las muestras sanas de ambas procedencias (Tabla 5).

EFNA1 EFNA3 EFNB2 EphB1 EphB6	EphA8 EphB2	EphA1 EphA2	Células B <i>ex vivo</i>	Casos coincidentes de LLC
+	-	+	GL	41
-	+	+	SP	9
+	+	+	Mezcla	30
-	-	-	NC	2

Tabla 5. Clasificación de B-LLC-SP acorde a su correspondencia con B-SP ó B-GL sanas atendiendo a perfiles de expresión de Eph/EFN. Atendiendo al patrón de expresión Eph/EFN observado en 82 muestras B-LLC, éstas fueron clasificadas de acuerdo a la expresión diferencial de estos miembros en B sanas, SP- o GL, mostrados en las primeras 3 columnas, agrupados por análisis de conglomerados jerárquico de las muestras (método del vecino más cercano). Resuelto en 4 grupos, que se corresponden con GL, SP, Mezcla (GL/SP) o NC (no correspondencia con ninguno de los anteriores). El número total de casos de B-LLC que se corresponden con cada grupo se muestra en la quinta columna. La primera y segunda columnas se corresponden a aquellos miembros Eph/EFN que mejor discriminaron entre los grupos de GL y SP de B sanos, respectivamente. La tercera columna contiene EphA1 y EphA2, puesto que estos receptores se encuentran en ambas procedencias. Otros miembros no se muestran bien porque su expresión no discrimina entre poblaciones (EphA4 ó EFNA4) o bien por encontrarse ausentes, tanto en las tres poblaciones a comparar (caso de EphA5, EphA7, EFNA2, EFNA5, EFNB1, EFNB2) como en la población a clasificar (caso de EphA3).

El resultado de este análisis agrupó las expresiones de B-LLC-SP, en primer lugar, con el patrón de ganglios (41/82), en segundo lugar, con el patrón mixto, -GL y -SP (30/82), y en último lugar con el patrón de Bs circulantes (9/82). Sólo 2 de los 82 casos B-LLC-SP analizados no pudieron ser agrupados en ninguno de los grupos anteriores. Consiguientemente, la expresión de Eph/EFN en B-LLC parece seguir un patrón más similar al de linfocitos B-GL que al de B-SP o mixto, lo que sugiere una relación más estrecha con un estado activado.

1.2.- Expresión Eph/EFN de células B-SP en cultivo *in vitro* bajo diferentes estímulos

En base a que, como sugieren los resultados anteriores, el patrón de expresión Eph/EFN en B-LLC-SP se asemeja más al de B-GL presumiblemente debido a que los B leucémicos presentan un estado activado, lo que ya había sido sugerido por otros autores (Aasheim y cols., 2000; Luo y cols., 2002; Freywald y cols., 2003), quisimos profundizar en este aspecto, analizando Eph/EFN en B-SP tras estimulación *in vitro*, tanto a través de BcR, utilizando anticuerpos α -IgM (B-SP + α -h-IgM), como de manera independiente a este receptor, con lipolisacáridos (LPS; B-SP + LPS), evaluando además si el tipo de estimulación podría proporcionarnos información en relación con la biología de la LLC.

Tras tres días de cultivo con los estímulos pertinentes se analizó el patrón de expresión Eph/EFN en ambos tratamientos y el de su correspondiente control sin estimular (Figura 13). Esto se llevó a cabo con 6 muestras sanas diferentes, para cada uno de los supuestos.

En ausencia de estímulo, las muestras B-SP perdían la expresión de la mayoría de Eph/EFN detectadas *ex vivo*, salvo EphA4 y EFNA4 presentes en las 6 muestras cultivadas. En el caso de los cultivos estimulados, tanto dependiente como independientemente de BcR, se perdió igualmente la expresión de ciertos miembros como EphA3 y EphA8, mientras se mantenía la presencia de EphA4 y EFNA4 y se observó neoexpresión de EphA10, EFNA1, EphB6 y EFN2. Por tanto, parece claro que la expresión de estos últimos miembros, está muy relacionada con el estado de activación del linfocito, independientemente de la vía de estimulación utilizada. Por otra parte, la importancia de una u otra vía de estimulación se manifestó a través de la expresión de otros miembros. Así, EphA1, EphA2 y EphB3, fueron

detectadas tras estimulación con α -h-IgM y, por tanto, dependiente de BcR; mientras que EphB2 y EphB4 fueron expresadas de forma diferencial tras estimulación con LPS y, por tanto, independiente de BcR.

Expresión Eph/EFN por RT-PCR

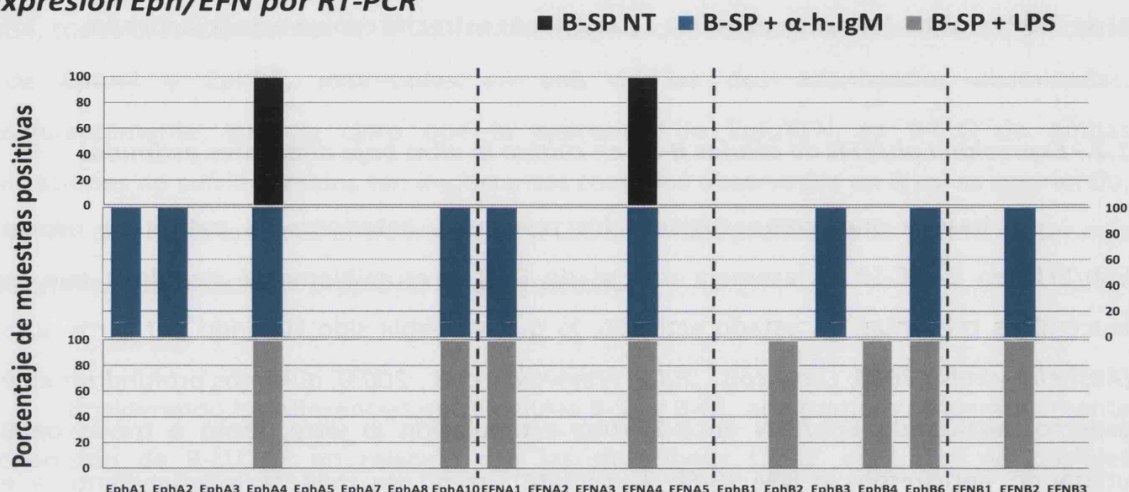


Figura 13. Perfil de expresión Eph/EFN, en células B sanas cultivadas sin estímulo o estimuladas. Linfocitos B CD19⁺ enriquecidos (>98% pureza) a partir de sangre periférica de individuos sanos (B-SP), se cultivaron durante tres días en ausencia (B-SP-No Tratadas) o presencia de los siguientes estímulos: anticuerpos conejo- α -h-IgM (B-SP + α -h-IgM), lipopolisacáridos (B-SP + LPS). La expresión de ARNm para Eph/EFN se determinó mediante RT-PCR.

Considerando los datos de expresión de Eph/EFN en B sanos obtenidos tras los estímulos (Figura 13) y relacionándolos con los observados en B-LLC-SP (Figura 12), nuevamente parecía claro que las muestras B-LLC presentan un fenotipo activado. El análisis de conglomerados, basado en los miembros expresados de forma diferencial en células B sanas cultivadas tras los diferentes estímulos (Tabla 6), confirmó que el 96,4% de las muestras LLC analizadas presentaba un fenotipo Eph/EFN activado (Anexo V, Tabla 1). Basándonos en este análisis, pudimos también determinar que las B-LLC-SP presentan, mayoritariamente, un fenotipo Eph/EFN que se corresponde al que presentan las B-SP tras activarlas *in vitro* a través de su BcR (65/82), bien de forma exclusiva (33/82), o bien de forma común a ambas rutas (32/82), mientras que tan sólo una pequeña parte (7/82) presentan un fenotipo de activación, de forma exclusiva, más similar al producido mediante LPS. 7 de las 82 muestras analizadas, presentaron un patrón mixto, entre dependiente e independiente de

BcR, y tan sólo 3 de las 82, no se ajustaron a ninguno de los perfiles obtenidos tras la activación.

EphA1 EphA2 EphB3	EphB2 EphB4	EphA1 EphA2	Células B <i>in vitro</i>	Casos coincidentes de LLC
-	-	+	Común	32
+	-	+	α-h-IgM	33
-	+	+	LPS	7
+	+	+	Mezcla	7
-	-	-	NC	3

Tabla 6. Clasificación del patrón de expresión de Eph/EFN de células B-LLC en relación con las estimulaciones *in vitro* de células B-SP. El perfil de expresión Eph/EFN observado para cada una de las muestras LLC se clasificó de acuerdo con aquellos miembros que mejor se discriminan entre *ex vivo* y activados (tres primeras columnas) por aplicación jerárquica de los agrupamientos de las muestras (método del vecino más cercano). Resuelto en 5 grupos que se corresponden con los perfiles Eph/EFN observados en los cultivos de B-SP tras las estimulaciones *in vitro*, siendo estos perfiles observados de forma Común (presentes en α -IgM y LPS), de forma exclusiva (α -IgM o LPS o Mezcla, α -IgM/LPS), y los NC (no correspondencia con ninguno de los anteriores). El número total de casos de B-LLC-SP que se corresponden a cada grupo se muestra en la quinta columna. La primera y segunda columna se corresponde a aquellos miembros Eph/EFN mejor discriminados entre los grupos de tratamiento de α -IgM y LPS, respectivamente. La tercera columna contiene aquellos miembros Eph/EFN modulados en común en ambos tratamientos. Otros miembros no mostrados, fueron excluidos del análisis puesto que no se observaron tras las estimulaciones (como EFNA3, EphA4, EphA8 o EphB1) y/o por estar ausentes en el perfil de B-LLC-SP (como EphA3, EphA5, EphA7, EFNA2, EFNA5, EFNB1, EFNB3).

Consiguientemente, los resultados obtenidos sugieren que atendiendo a su patrón de expresión de Eph/EFN, las células B de sangre periférica de los pacientes LLC se encuentran activadas y que en la mayoría de los casos esta activación se debía presumiblemente a que en algún momento recibieron estimulación antigénica a través de su BcR.

1.3.- La particular condición de la EFNA4

Como se comentaba anteriormente, la amplificación por RT-PCR de EFNA4 en las diferentes muestras B estudiadas se resolvió en dos productos de distinto tamaño en todos los casos analizados (Figura 14 A). Ambos productos fueron clonados y secuenciados, comprobándose que el de mayor tamaño se correspondía a la ya descrita variante 1 de la EFNA4 (1276 pb) (GenBank NM_005227.2), que codifica para la proteína unida a membrana a

través de GPI, mientras que el de menor tamaño se correspondía con una variante no descrita hasta ese momento (Aasheim y cols., 2000). Coincidiendo con este hallazgo, los mismos autores hicieron pública una isoforma nueva de EFNA4 (GenBank NM_182689.1), denominándola variante 2, que se correspondía con la encontrada por nosotros. Esta isoforma resulta de un procesamiento (corte y empalme) alternativo del ARNm de la isoforma larga que conlleva pérdida de un fragmento exónico y desplazamiento en el marco de lectura tras la unión y cuyo producto teórico corresponde a una proteína con un N-terminal más largo, pasando de 201 aa de la variante 1 a 207 aa, que carece del dominio de unión a GPI. El análisis de la secuencia peptídica teórica predecía una forma soluble de la molécula, presumiblemente una forma secretada.

Mediante Q-RT-PCR se determinó la cantidad relativa de cada una de estas dos variantes en las distintas muestras, B-LLC y B sanas, analizadas en los apartados anteriores. Para ello se diseñaron cebadores, adecuados a esta PCR a tiempo real, que amplificaran de manera diferencial cada una de las isoformas, siguiendo el esquema mostrado en la *Figura 14 B*, y usando β -actina como control interno.



Figura 14. Isoformas de EFNA4. **A)** El análisis de expresión realizado mediante RT-PCR, reveló la presencia de dos isoformas para EFNA4, una de mayor tamaño, 563 pb, EFNA4-L y otra de menor, 397 pb, EFNA4-S. La intensidad de las bandas para estas isoformas difería tanto entre tipos de muestras como dentro de cada tipo, mientras que la intensidad β -actina, elegida como control interno, era similar en todos los casos. Los canales se corresponden con: 1-2: B-SP, 3-4: B-GL, 5: B-SP-NT, 6: B-SP + α -IgM, 7: B-LLC. **B)** Representación de los cebadores diseñados para la cuantificación específica de cada banda por Q-RT-PCR. 5'-L y 3'-L, cebadores para la isoforma Larga. 5'-S y 3'-S, cebadores para la isoforma Corta.

Los datos obtenidos mediante Q-RT-PCR (*Figura 15*) sugerían que el contenido de cada isoforma difiere dependiendo de la procedencia de los linfocitos B. El análisis revela que mientras que el contenido de ambas isoformas es similar en B-GL, en B-SP la forma larga

predomina sobre la corta (*Figura 15 A*). Los resultados de cuantificación procedentes de los cultivos *in vitro* de B-SP en presencia de α -h-IgM o LPS revelaron que la presencia de uno u otro estímulo conllevaba un incremento considerable del contenido de la isoforma corta de EFNA4 en relación a B-SP (*Figura 15 A*). En B-LLC-SP el contenido de la forma larga era más similar al de la forma corta que en B-SP (*Figura 15 A*). Sin embargo, al relativizar el contenido de cada isoforma en B-LLC-SP al de B-SP usada como calibrador, se observaba que la cantidad de la isoforma corta en B-LLC-SP está significativamente incrementada (cuadrante inferior derecho de la *Figura 15 B*) respecto a la de los B sanos.

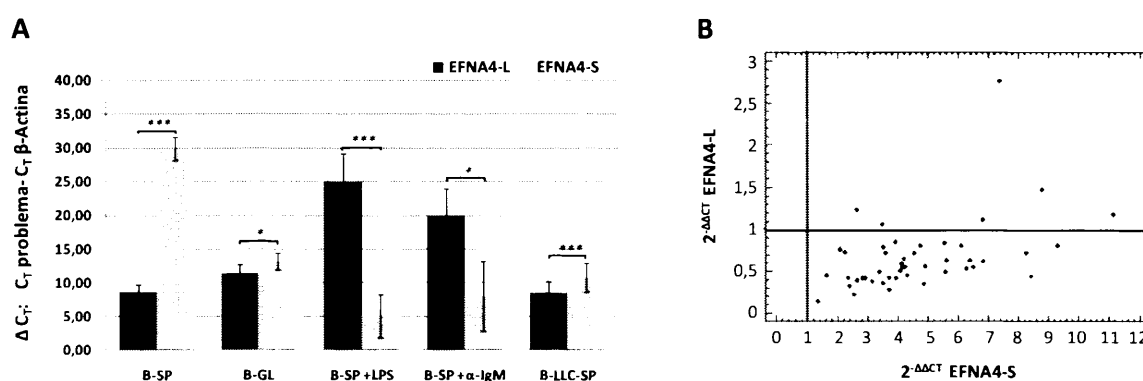


Figura 15. Cuantificación mediante Q-RT-PCR de las isoformas de EFNA4. A) Obtenidos los C_T , PROBLEMA Y C_T , β -ACTINA se calculó el valor ΔC_T , que es inversamente proporcional al contenido del gen problema. Las Q-RT-PCR se llevaron a cabo con 6 muestras B-SP, 4 B-GL, 6 B-SP+LPS, 6 B-SP+ α -h-IgM y 82 B-LLC-SP. Las diferencias significativas se representan en base al valor de su estadístico (* p <0,05; ** p <0,01; y *** p <0,005). B) Contenido relativo de EFNA4-L y EFNA4-S ARNm en B-LLC-SP (problema) relativizado a B-SP (calibrador, trazos continuos, valor=1) mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, donde $\Delta\Delta C_T$ se define como: $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$, PROBLEMA - ΔC_T , CALIBRADOR.

1.4.- Expresión Eph/EFN en relación con las características clínicas de los pacientes de LLC

Parecía, por tanto, evidente que las células B-LLC-SP presentaban una expresión alterada de Eph/EFN comparado con su homólogo en la población sana pero similar, de alguna manera, al que presentaban las células B activadas. Puesto que la LLC es una enfermedad heterogénea, quisimos determinar si los patrones de expresión de Eph/EFN podrían responder a la condición clínica de los pacientes estudiados.

Previo a este análisis, se realizó una prueba estadística para determinar las posibles asociaciones positivas (co-expresiones) o negativas, entre los distintos miembros de la familia Eph/EFN en las B-LLC-SP. Mediante análisis de contingencia (*Tabla 7*), se puso de manifiesto la existencia de asociaciones significativas entre algunos de los miembros, aunque en general débiles. Curiosamente, se encontró que EphA1 y EphB6 presentaban una asociación negativa ($p<0,01$), sugiriendo que la presencia de estos miembros en B-LLC, podría estar asociada a una característica distintiva y excluyente en la enfermedad.

Clase A							Clase B					
EFN		Eph					EFN		Eph			
A1	A3	A1	A2	A4	A8	A10	B2	B1	B2	B3	B4	B6
A1	**			*		*		**	**			
	A3			**		*	**	**				*
		A1				*					**	##
			A2	*				**				**
				A4	*		**	*				*
					A8							
						A10		**				*
							B2		*	*		
								B1				*
									B2			
										B3		
											B4	
												B6

Tabla 7. Tabla de contingencia de la expresión de Eph/EFN en células B-LLC-SP para el análisis de asociaciones. La tabla de contingencia se llevó a cabo con la expresión de los miembros de Eph/EFN observados en las muestras de B-LLC-SP con el fin de determinar la importancia de las co-expresiones de Eph/EFN. El análisis estadístico de χ^2 fue empleado para determinar las asociaciones significativas entre las parejas de variables. Tan sólo se mostraron las asociaciones significativas, directamente, * $p<0,05$; ** $p<0,01$; e inversamente ## $p<0,01$.

Seguidamente, se analizó la significación estadística de las relaciones entre presencia/ausencia de Eph/EFN o, en el caso de EFNA4, la cantidad de ARNm de cada una de las isoformas cuantificadas mediante Q-RT-PCR, en relación con 1.- el contenido de ZAP-70 ARNm, como posible marcador subrogado en la prognosis de la enfermedad, 2.- el estadio de riesgo (Rai), 3.- la evolución de la enfermedad 4.- linfocitosis y, 5.- linfadenopatías, puesto que estos fueron los únicos datos clínicos disponibles para un mayor número de los pacientes analizados.

Los análisis estadísticos realizados (*Tabla 8*) mostraron que la presencia de linfadenopatías se asociaba inversamente con la expresión de EFNA1 ($p<0,05$) y, aunque no

de manera estadísticamente significativa, las moléculas EFNA3 y EphB1 también parecían mostrar esta asociación inversa entre su expresión y la ausencia de linfadenopatías. El análisis de EFNA4 realizado a través de Q-RT-PCR reveló que la forma larga de esta molécula se asociaba significativamente con pacientes que no presentaban linfadenopatías mientras que la forma corta lo hacía con los pacientes que sí las presentaban.

A

		Linfoadenopatía			Riesgo				Evolución			Linfocitosis		ZAP-70	
		No	Sí	p-valor	Bajo	Int.	Alto	p-valor	E	P	p-valor	Media \pm desv.	p-valor	Media \pm desv.	p-valor
EFNA1	+	11	4	0,043	10	4	1	0,05	1	8	NS	41,19 \pm 12,44	NS	12,45 \pm 3,56	NS
	-	28	40		26	33	9		7	46		47,50 \pm 6,06		8,95 \pm 1,12	
EFNA3	+	13	9	NS	12	7	3	NS	1	12	NS	60,97 \pm 14,37	NS	10,99 \pm 2,45	NS
	-	26	35		24	30	7		7	42		42,76 \pm 5,74		9,05 \pm 1,24	
EphA1	+	6	6	NS	5	7	0	NS	2	8	NS	28,58 \pm 6,65	0,026	5,37 \pm 1,26	0,012
	-	33	38		31	30	10		6	46		50,04 \pm 6,29		10,24 \pm 1,26	
EphA2	+	17	13	NS	16	10	4	NS	3	18	NS	39,77 \pm 9,13	NS	10,15 \pm 1,71	NS
	-	22	31		20	27	6		5	36		49,15 \pm 6,71		9,28 \pm 1,53	
EphA4	+	20	13	NS	18	11	4	NS	1	20	NS	55,79 \pm 10,42	NS	11,38 \pm 1,98	NS
	-	19	31		18	26	6		7	34		40,76 \pm 5,94		8,51 \pm 1,35	
EphA8	+	11	12	NS	10	10	3	NS	0	16	NS	43,53 \pm 8,01	NS	12,92 \pm 2,29	NS
	-	28	32		26	27	7		8	38		48,03 \pm 7,16		8,21 \pm 1,24	
EphA10	+	26	30	NS	25	25	6	NS	5	36	NS	49,80 \pm 6,94	NS	9,98 \pm 1,44	NS
	-	12	14		10	12	4		3	18		41,48 \pm 8,94		8,79 \pm 1,72	
EFNB2	+	4	6	NS	4	4	2	NS	0	8	NS	80,44 \pm 17,45	0,006	10,37 \pm 3,92	NS
	-	35	38		32	33	8		8	46		40,07 \pm 5,20		9,54 \pm 1,18	
EphB1	+	11	5	NS	11	4	1	0,048	2	9	NS	30,74 \pm 14,40	NS	11,50 \pm 2,64	NS
	-	28	39		25	33	9		6	45		48,93 \pm 5,88		8,96 \pm 1,22	
EphB2	+	4	3	NS	4	3	0	NS	0	7	NS	38,27 \pm 16,04	NS	20,35 \pm 5,13	0,008
	-	35	41		32	34	10		8	47		47,64 \pm 5,85		8,82 \pm 1,09	
EphB3	+	4	4	NS	4	4	1	NS	1	5	NS	49,27 \pm 15,73	NS	9,69 \pm 2,86	NS
	-	35	40		32	33	10		7	49		46,24 \pm 5,87		9,64 \pm 1,22	
EphB6	+	17	22	NS	16	18	5	NS	0	28	0,006	61,98 \pm 10,33	0,027	13,66 \pm 1,86	0,001
	-	22	22		20	19	5		8	26		35,45 \pm 5,11		5,89 \pm 0,91	

B

EFNA4	Linfoadenopatía			Riesgo				Evolución			Linfocitosis	ZAP-70
	No	Sí	p-valor	Bajo	Int.	Alto	p-valor	E	P	p-valor		
Larga	0,67 \pm 0,17	0,54 \pm 0,17	0,029	0,69 \pm 0,04	0,54 \pm 0,04	0,41 \pm 0,04	<0,005	0,74 \pm 0,07	0,53 \pm 0,03	0,029	NS	NS
Corta	4,06 \pm 1,62	8,02 \pm 4,33	<0,005	4,14 \pm 0,38	7,60 \pm 0,85	6,27 \pm 1,27	<0,005	4,43 \pm 0,53	6,81 \pm 0,66	NS	NS	NS

Tabla 8. Análisis de la expresión de Eph-EFN en relación con las características clínicas de los pacientes. A) Los datos obtenidos a través de RT-PCR, presencia/ausencia de los miembros de esta familia, fueron analizados a través de una tabla de contingencia, evaluando las posibles relaciones a través de una prueba χ^2 con corrección exacta de Fisher y nivel de significación 0,05. La linfocitosis (expresada en $10^9/L$) y el contenido de ARNm de ZAP-70, obtenido mediante Q-RT-PCR, se evaluaron mediante T-Student, con dos colas de distribución. **B)** Los datos obtenidos mediante Q-RT-PCR referentes a la cantidad de ARNm de cada una de las isoformas de EFNA4, expresados como número de veces relativo a B-SP, se analizaron frente a los parámetros clínicos. NS, No Significativa; Int., Intermedio; E, Estable; P, Progresa. Este estudio se realizó con 82 muestras con las cuales se valoró la linfadenopatía, el riesgo, la linfocitosis y el contenido en ZAP-70. De estas 82 muestras, 62 habían sido diagnosticadas al menos 1 año antes, clasificándolas como estables (E, n=8) o progresiva (P, n=54). Las asociaciones más desfavorables se indican con un círculo rojo, mientras que las menos desfavorables se indican con un círculo verde.

En relación con el estadio Rai modificado (bajo, medio y alto riesgo) se observó que determinados miembros de esta familia parecen expresarse preferentemente en pacientes

que se presentan en un riesgo bajo, como son EphB1 ($p<0,05$), EFNA1 ($p=0,05$) ó EFNA3 (NS), al igual que la isoforma larga de EFNA4 ($p<0,005$), mientras que la corta se relaciona con pacientes que se presentan en un riesgo intermedio ($p<0,005$).

De las 82 muestras LLC evaluadas, 62 habían sido diagnosticadas al menos 1 año antes de la primera determinación de expresión de Eph/EFN, mientras que las restantes 20 muestras se correspondían con primeras determinaciones. Por tanto, pudimos analizar en estas 62 muestras la expresión de Eph/EFN en relación con la evolución de la enfermedad (progresiva, P, o estable, E) en base a progresión de estadio, TDL<12meses y/o necesidad de tratamiento. En este análisis se concluía que la expresión de EphB6 se correlacionaba ($p<0,01$) con los pacientes que presentaban progresión en su enfermedad, encuadrándose los 28 casos donde se encontró la expresión de EphB6, dentro de este grupo de pacientes, mientras que todos los pacientes con enfermedad estable no expresaban esta molécula. De manera análoga, pero no significativa, encontrábamos EphA8 (16 casos encontrados), EphB2 (8 casos) y EFNB2 (7 casos) asociadas a pacientes que presentaban progresión de la enfermedad, mientras que en pacientes estables estas moléculas no se expresaron. En cuanto a las isoformas de EFNA4 determinadas mediante Q-RT-PCR, se encontró correlación entre la forma larga y los pacientes cuya enfermedad permanecía estable y, aunque la cantidad de la isoforma corta es más alta en pacientes cuya enfermedad progresa, no se ha encontrado una relación estadísticamente significativa.

De la misma manera, se determinó la posible relación entre la expresión de los distintos miembros y el grado de linfocitosis de los pacientes. En relación con ello, se encontró asociación positiva significativa ($p<0,01$) en los pacientes que expresaban EFNB2 cuya linfocitosis era de media más alta que la de aquéllos que no la expresaban ($80,11 \pm 17,75 \times 10^9/L$ versus $40,07 \pm 5,20 \times 10^9/L$, respectivamente). De forma similar, los pacientes que expresaban EphB6 presentaban linfocitosis más marcada que aquéllos en los que no se detectó esta molécula ($61,98 \pm 10,33 \times 10^9/L$ versus $35,45 \pm 5,11 \times 10^9/L$, respectivamente; $p<0,05$). Por el contrario, los pacientes con expresión de EphA1 presentaban una linfocitosis moderada en relación a los que no expresaban esta molécula ($28,56 \pm 6,65 \times 10^9/L$ versus $50,04 \pm 6,29 \times 10^9/L$; $p<0,05$). Para este parámetro, no se encontró ninguna relación significativa con el contenido de las distintas isoformas de EFNA4 evaluadas.

Conocido el potencial papel de ZAP-70 como marcador molecular subrogado de pronóstico en la LLC (Luo y cols., 2002; Orchard y cols., 2004) quisimos relacionarlo con los patrones de Eph/EFN. Para ello, primeramente se determinó si el contenido de ARNm para esta molécula en las muestras, B-LLC-SP y B-SP, podía co-relacionarse con la evolución de la enfermedad (Figura 16) atendiendo, bien a la progresión del estadio bien a la necesidad de tratamiento (aparición de sintomatología clínica asociada a la enfermedad, tiempo de duplicación leucocitaria (TDL) < 1 año o ambos). La cantidad de ARNm para ZAP-70, determinado mediante Q-RT-PCR en las células B-LLC se normalizó a la obtenida en células B sanas, mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizado para la cuantificación. Así, pudimos determinar que el contenido de ARNm de ZAP-70 de los pacientes de LLC, era significativamente mayor en los que presentaban progresión ($14,12 \pm 8,48$ versus $3,17 \pm 1,95$; $p < 0,01$) o habían necesitado tratamiento ($16,20 \pm 2,89$ versus $5,38 \pm 1,58$ $p < 0,01$).

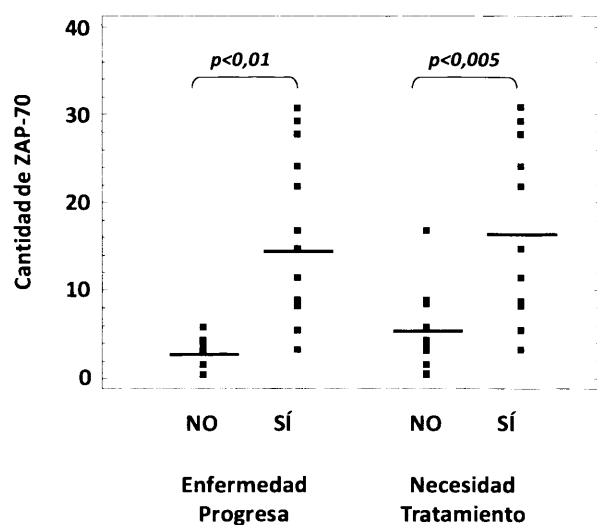


Figura 16. Contenido de ZAP-70 ARNm en B-LLC-SP en relación con el comportamiento clínico. Mediante Q-RT-PCR se determinó el contenido de ARNm de ZAP-70, marcador de pronóstico en B-LLC-SP. Los valores medios obtenidos se compararon entre grupos de pacientes LLC acorde a la progresión de estadio o la necesidad de tratamiento de los mismos, determinando la significación estadística de la diferencia de las medias mediante un estadístico T-Student, teniendo en cuenta una distribución de dos colas. Para este estudio se contó con datos de al menos 1 año previos a la determinación en 62 pacientes LLC.

El estudio en muestras B-LLC-SP del contenido en ZAP-70 en relación con la presencia/ausencia de Eph/EFN, mostró que la presencia de EphA1 se asociaba con bajas cantidades de este marcador de pronóstico ($5,37 \pm 1,26$ versus $10,24 \pm 1,26$; $p < 0,05$), mientras que la presencia de EphB2 ($20,35 \pm 5,133$ versus $8,82 \pm 1,09$; $p < 0,01$) y, especialmente, EphB6 ($13,66 \pm 1,86$ versus $5,89 \pm 0,91$; $p < 0,005$), se asociaban significativamente con las muestras que presentaban un mayor contenido en ZAP-70.

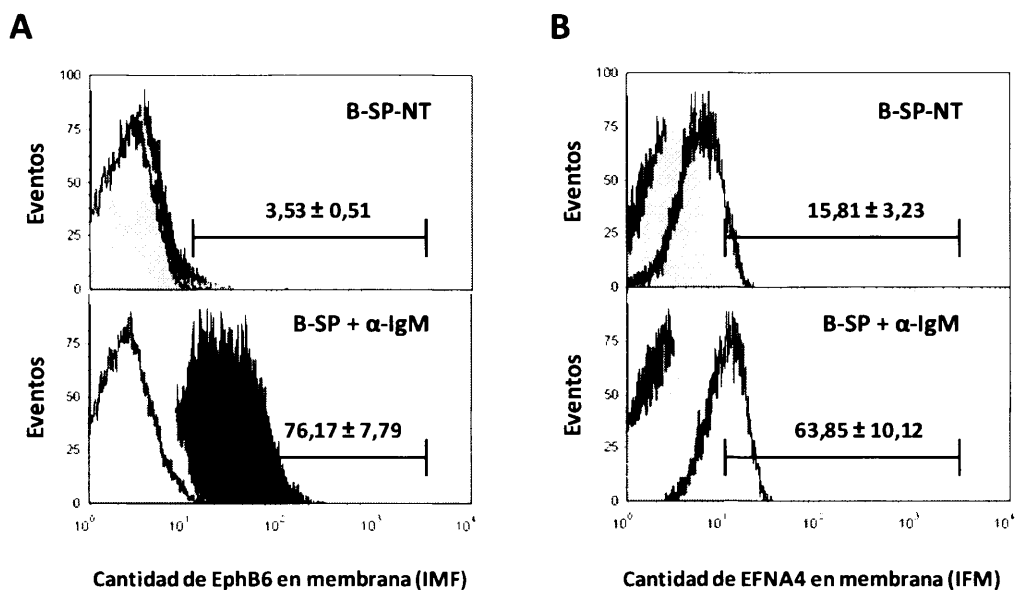


Figura 18. Evaluación mediante citometría de flujo de expresiones de EphB6 o EFNA4 en B-SP estimuladas in vitro. Las células de interés purificadas se cultivaron durante 72 horas sin (B-SP-NT) y con estímulos, α-IgM (B-SP + α-IgM). Recogida la totalidad de la población cultivada, se realizó una tinción con α-CD19-PE y α-CD5-PE-Cy5, junto con la proteína a evaluar mediante citometría de flujo. La población de interés se acotó por FSC/SSC y expresión de CD19. Para la correcta evaluación se realizaron los controles necesarios en cada caso. **A)** Intensidad media de fluorescencia (IMF) para EphB6 (Histograma vacío, h-Fc + SAV-Alexa-Fluor®488; Histograma gris, h-Fc + cabra-IgG + α-cabra-488; Histograma negro, α-h-EphB6-b + SAV-Alexa-Fluor®488). **B)** Intensidad media de fluorescencia (IMF) para EFNA4 (Histograma negro, h-Fc + SAV-Alexa-Fluor®488; Histograma gris, h-Fc + cabra-IgG + α-cabra-Alexa-Fluor®488; Histograma vacío, α-h-EFNA4-b + SAV-Alexa-Fluor®488). Los datos representados de IMF hacen referencia a la media y a la desviación estándar de cada uno de los casos.

De estos datos, podíamos concluir que la determinación por citometría de flujo de EphB6 ó EFNA4 en muestras LLC podía ser una aproximación factible de cara a su posible utilidad clínica.

1.6.- Caracterización de EFNA4 soluble en plasma de pacientes LLC

La presencia de una nueva isoforma de EFNA4, presumiblemente codificante de una proteína soluble, hacía pensar que ésta pudiera encontrarse en el plasma de los pacientes, algo que se analizó mediante *Western-Blot* (Figura 19). Comparando los resultados de sueros de pacientes con los de sanos, encontramos una banda diferencial, con un peso molecular de aproximadamente 30 kDa, entre ambos tipos de sueros. Lo que sugería que la proteína

codificada por el ARNm mensajero para la isoforma corta y la proteína detectada en suero, pudieran ser la misma.

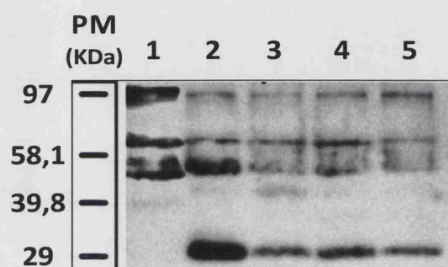


Figura 19. Mediante Western-Blot se detectó la presencia de una proteína de 30 kDa presente en el suero de pacientes, pero no en el de sanos. La presencia de EFNA4 fue determinada mediante SDS-PAGE en el suero, tanto de donantes sanos (línea 1), como de pacientes con LLC (líneas 2-5). De 20 a 40 g de proteína total, empobrecida previamente de albúmina humana, fue separada mediante SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes y transferida a membrana, donde se detectarán las isoformas de EFNA4, gracias al uso de α -h-EFNA4-b, junto con SAV-HRPO. El patrón molecular (PM) se expresa en KDalton (kDa).

Confirmada la presencia de una forma soluble de EFNA4 en los sueros de pacientes, procedimos a su cuantificación mediante ensayos de ELISA y relacionamos esta cuantificación con los parámetros clínicos de la enfermedad (Figura 20). Los pacientes que presentan adenopatías muestran cantidades heterogéneas de EFNA4 en suero, cuyo intervalo oscila entre 0,21 y 2,92 ng/mL, con una media de 1,63 ng/mL, la cual es significativamente más alta ($p < 0,005$) a la mostrada por pacientes que no presentan adenopatías, 0,78 ng/mL. Estos últimos pacientes mostraban una cantidad de EFNA4 mucho más homogénea, siendo su distribución 0,18 a 1,87 ng/mL (Figura 20 A). Los niveles de EFNA4 encontrados en el suero de los pacientes se asociaban significativamente ($p < 0,01$) mediante una correlación de Spearman de 0,75 con la linfocitosis que presentaban (Figura 20 B), de manera que cuanto mayor era la linfocitosis presentada, mayor era la cantidad de EFNA4 detectada en su suero.

Los datos anteriormente descritos indican que, tanto EphB6 como EFNA4, se asocian preferentemente con determinados parámetros clínicos: especialmente la presencia de EphB6 y la de la isoforma corta de la EFNA4 se asocian a mal pronóstico de manera complementaria, presencias que podrían usarse como marcadores de mal pronóstico de la enfermedad.

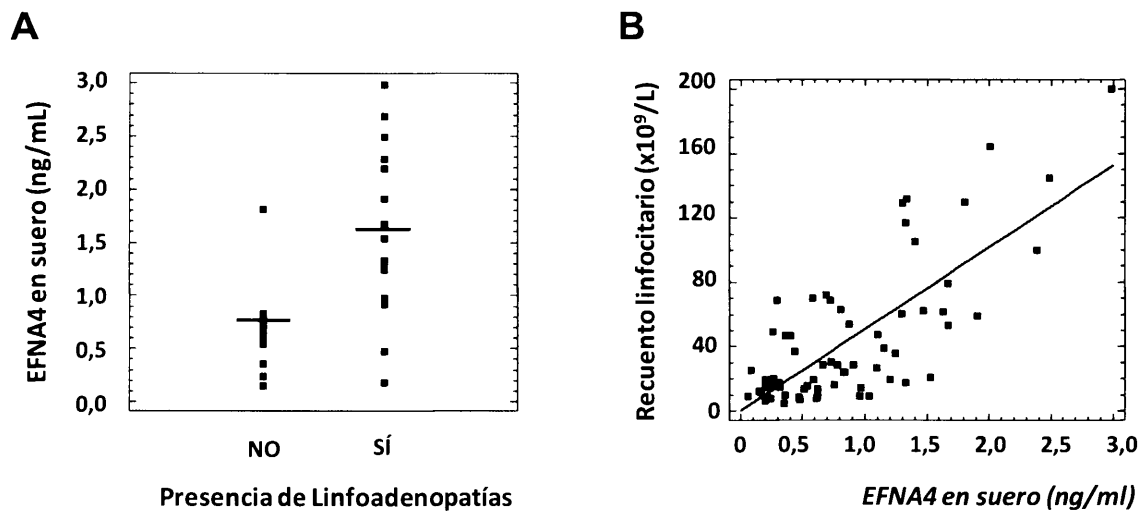


Figura 20. Cuantificación de EFNA4 en suero. Mediante un ELISA tipo sándwich se determinó el contenido de EFNA4 en suero a través del uso de anticuerpos policlonales, α -h-EFNA4 y α -h-EFNA4-b. Obtenidas las cuantificaciones, de hasta 3,00 ng/mL, se relacionaron estas con linfadenopatía o linfocitosis. En relación con presencia/ausencia de linfadenopatías, **A**, se encontró asociación entre un mayor contenido de EFNA4 en suero y la presencia de linfadenopatías, (Comparación de medias mediante estadístico T-Student con dos colas de distribución, $p < 0,005$). En relación con linfocitosis, **B**, el contenido de EFNA4 en plasma correlacionó positivamente (coef. Corr. Spearman = 0,75, $p < 0,01$) con el grado de linfocitosis

1.7.- Estudio del patrón de expresión tisular de Eph/EFN en linfadenopatías LLC

Seguidamente, quisimos determinar el patrón de expresión tisular, en linfadenopatías, de distintos miembros Eph/EFN, mediante inmunofluorescencia. Concretamente, se analizó la expresión de los posibles receptores para EFNA4 cuya sobreexpresión en LLC y su aparente relación con linfadenopatías despertaba un interés especial. Los resultados más relevantes, concernientes a la expresión de los receptores EphA2, EphA3, EphA4 y EphA8 (*Figura 21*), mostraban que EphA2 se expresaba fuertemente en estructuras vasculares CD31⁺; EphA3 y EphA4 lo hacían en células negativas para CD31 y CD19, mientras que EphA8 no presentaba una distribución tisular asociada a un tipo celular concreto, sino que más bien se expresaba en las propias células B-LLC.

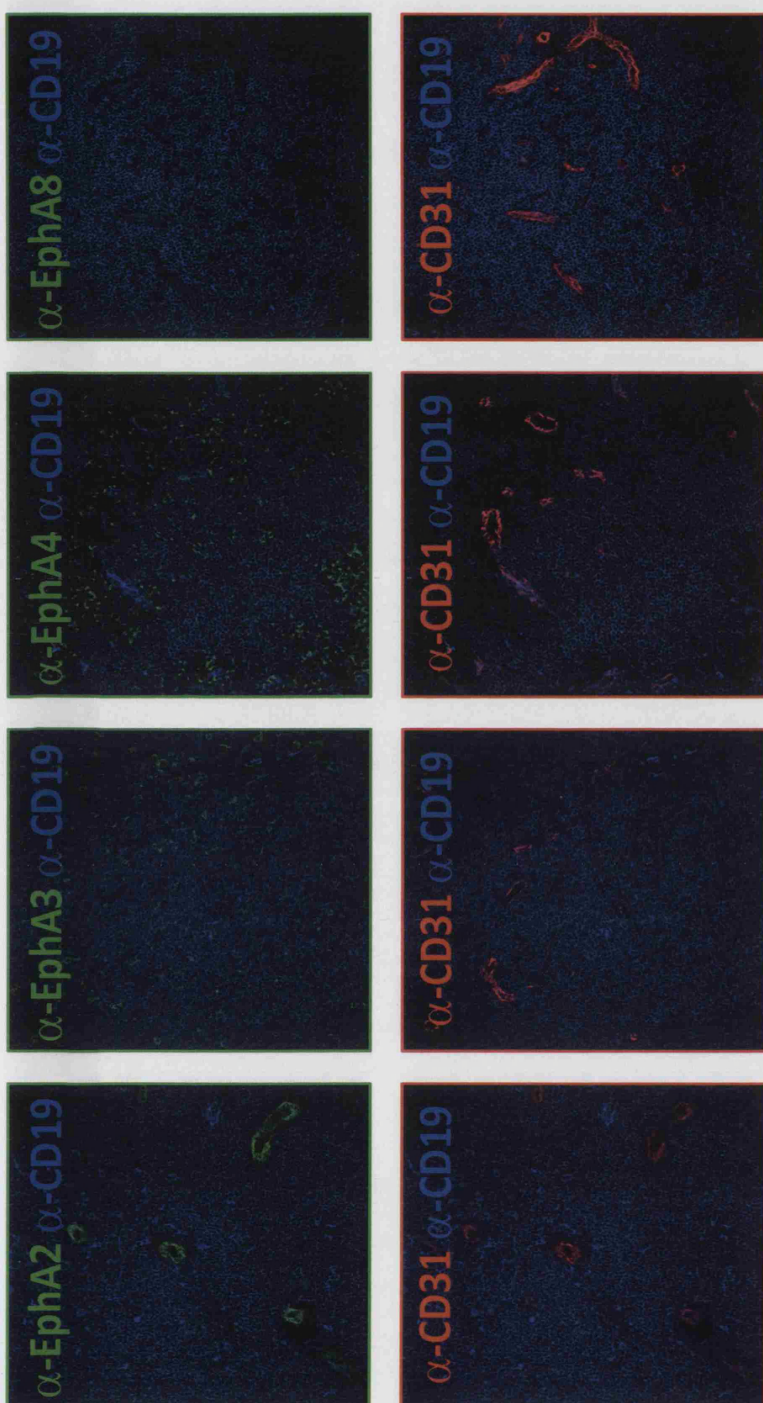
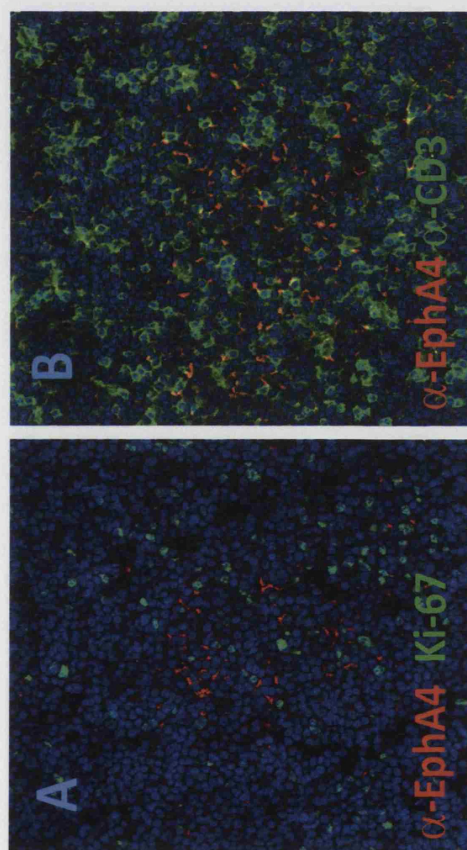


Figura 21. Análisis por inmunofluorescencia de receptores EphA en GL-LLC. Crio-secciones de 8 μm de grosor procedentes de linfadenopatías B-LLC fijadas en acetona se incubaron con anticuerpos α -EphA2, α -EphA3, α -EphA4 ó α -EphA8 (verde) y α -CD19 (azul), α -CD31 (rojo). Las imágenes de fluorescencia se adquirieron en un microscopio confocal (Leica TCS-SP2 AOBs) (objetivo inmersión en aceite, 20x, 1.20 NA).

Figura 22. Las linfadenopatías LLC contienen células EphA4+ CD3+ que se acumulan en áreas ricas en células ki-67+, presumiblemente centros proliferativos o pseudofoliculos. Crio-secciones de 8 μm de grosor de linfadenopatías B-LLC, se incubaron con **A)** α -Ki-67 (verde), α -EphA4 (rojo) o **B)** α -CD3 (verde), α -EphA4 (rojo). Los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst 33342 (azul). Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal (Leica TCS-SP2 AOBs) (Objetivo 63X de inmersión en aceite, 1.40 NA).



El marcaje con α -EphA4 revelaba una particular disposición de células CD19⁻ (*Figura 22*), disposición que recordaba a la de los *pseudofolículos* o *centros de proliferación*, en los que, como su mismo nombre indica, existía una mayor proporción de células B-LLC proliferantes (Ki-67⁺). Estos pseudofolículos, compuestos por B-LLC y otros tipos celulares, se han descrito en ganglios linfáticos, pulpa blanca del bazo y médula ósea de pacientes en los que se observa infiltración de B-LLC (*Patten y cols., 2008*) y constituyen un rasgo morfológico absolutamente patognomónico de la enfermedad, aunque su presencia no es constante y puede depender del grado de afectación del órgano. Los análisis por inmunofluorescencia revelaron una acumulación de células ki-67⁺ en las áreas EphA4⁺ (*Figura 21, marcaje α -EphA4, α -CD19*) que, por ausencia de expresión de CD19 hacían pensar en que pudiera tratarse de linfocitos T, puesto que este tipo celular se concentra de forma característica en estas estructuras (*Patten y cols., 2008*). Para comprobar ambos resultados, se realizaron nuevos marcajes con Ki-67, para detectar la mayor actividad de proliferación asociada a esos centros (*Figura 22 A*) y con α -CD3, para confirmar la presencia de los linfocitos T en estos centros proliferativos (*Figura 22 B*), además del marcaje con α -EphA4. En la *Figura 22 A*, se observa la presencia de células proliferantes (marcadas en verde), cercanas a zonas EphA4⁺ (marcadas en rojo), pero no co-localizantes; mientras que en la *Figura 22 B*, observamos zonas co-localizantes (amarillas) que indican que los linfocitos T (en verde) expresan EphA4 (en rojo).

Se ha apuntado que las señales derivadas por estos linfocitos T, bien de membrana (CD40L) bien solubles, a través de interleucinas, podrían promover la proliferación celular de las células B en estas áreas (*Patten y cols., 2008; Plander y cols., 2009*) por lo que, en base a estos resultados, parece plausible la posibilidad de que EphA4, receptor de EFNA4 pero también de otras EFN incluidas tipo B, represente otra de estas señales que promuevan la proliferación de las células B.

La sobreexpresión de EFNA4 en B-LLC, comparado con los niveles observados en B-SP, y su expresión diferencial en la enfermedad en relación con presencia/ausencia de linfadenopatías, sugerían la posibilidad de que esta molécula pudiera estar implicada en la diseminación a tejidos linfoides que tiene lugar en el curso de la enfermedad en algunos pacientes. Por otra parte, el estudio de receptores EphA mediante inmunofluorescencia había revelado una alta expresión del receptor EphA2 en estructuras vasculares CD31⁺ en ganglios (*Figura 22 A*), las cuales eran mayoritarias en el caso de las linfadenopatías LLC analizadas en comparación con los ganglios control (*Figura 22 B*). Todo ello, sugería la posibilidad de que la interacción EphA2-EFNA4 entre endotelios y B-LLC podría ser relevante en la migración transendotelial (TEM, *Trans Endothelial Migration*) de estas últimas, un fenómeno determinante para la diseminación de esta enfermedad y en cáncer en general pero también, como han apuntado algunos autores (*Butler y cols., 2010; Kobayashi y cols., 2010*), por el posible papel que los endotelios o las células endoteliales “aisladas” juegan por sí mismas en la supervivencia y/o “diferenciación” de los tumores.

2.- Papel de la interacción EphA2-EFNA4 en la migración transendotelial (TEM) de B-LLC

2.1.- El papel de EFNA4 en la migración transendotelial (TEM) de B-LLC

Como punto de partida en la evaluación del posible papel de EFNA4 en la TEM de B-LLC se caracterizó, en mayor profundidad, las estructuras vasculares de las adenopatías, en relación con su expresión de Eph. Así, se analizó en primer lugar, mediante citometría de flujo, la capacidad de las células endoteliales procedentes de adenopatías para unir EFNA4. El estudio se realizó incubando, con EFNA4-Fc recombinante, las suspensiones celulares obtenidas de las adenopatías e identificando la población endotelial como las células CD31⁺ de mayor expresión encontradas tras acotar las poblaciones negativas para CD19, CD5 y CD3 (*Figura 23*).

El análisis comparativo de las diferentes poblaciones que forman parte de las adenopatías mostró que prácticamente toda la población CD19⁻CD5⁻CD3⁻, con mayor expresión de CD31, unía EFNA4-Fc, sugiriendo que las células endoteliales podrían interaccionar con las células B-LLC a través de la EFNA4 expresada por éstas.

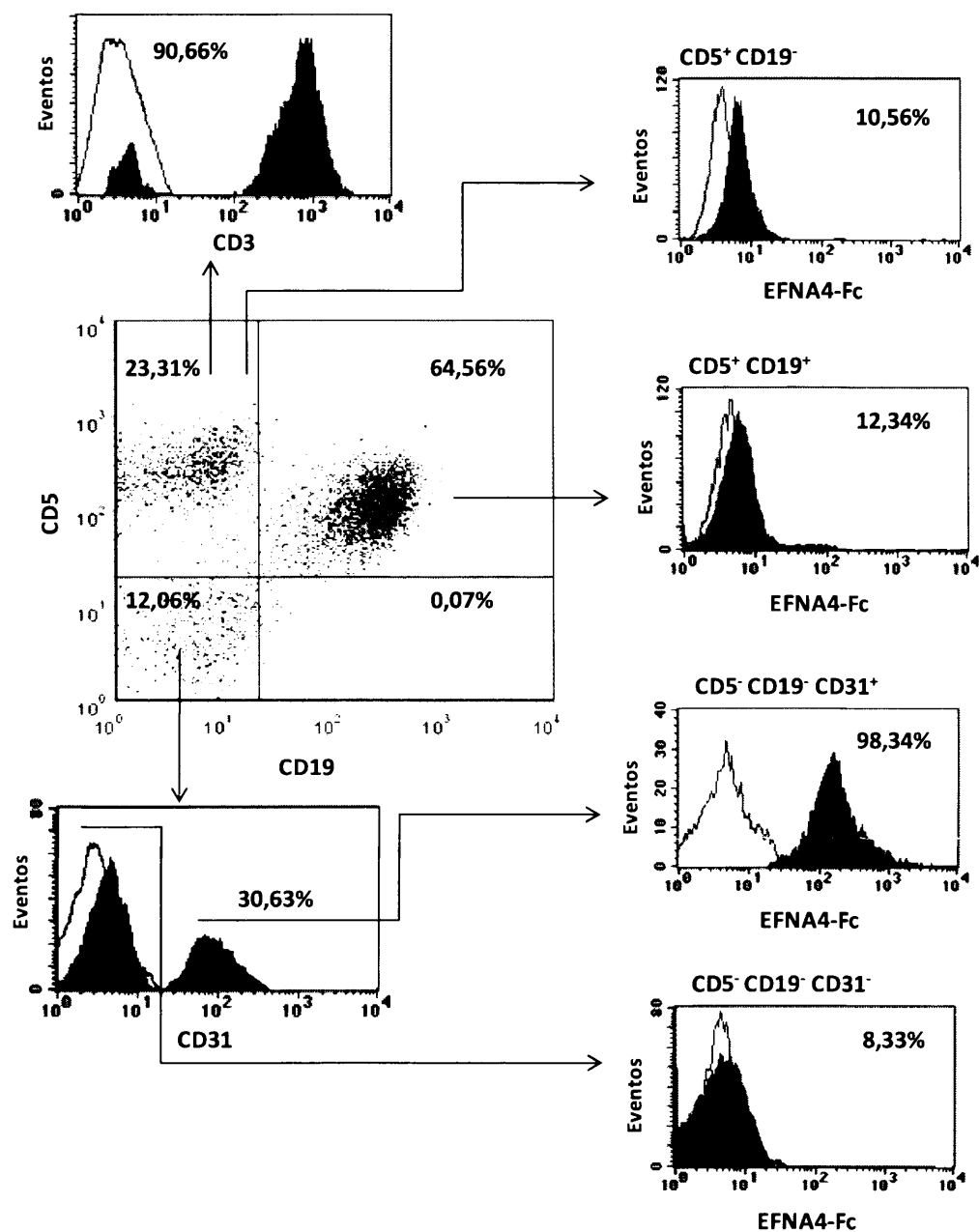
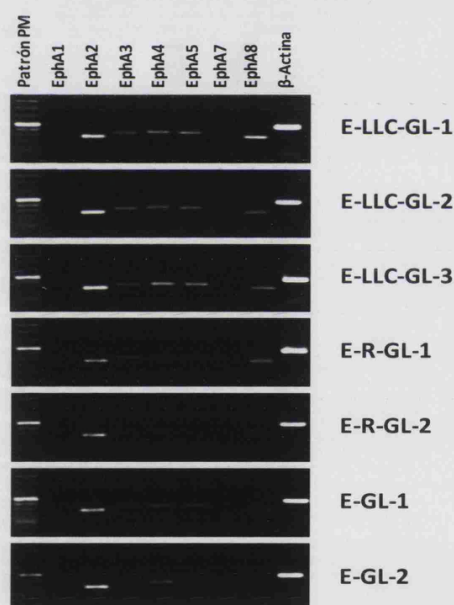


Figura 23. La población CD5-CD9-CD31⁺ de linfadenopatías une fuertemente EFNA4-Fc. Suspensiones celulares de linfadenopatías LLC, se incubaron con h-Fc y posteriormente rh-EFNA4-Fc (0,5 $\mu\text{g}/10^6$ cel.). La unión de la proteína recombinante se visualizó con anticuerpo $\alpha\text{-Hist-FITC}$. La tinción se combinó con $\alpha\text{-CD19-PE}$, $\alpha\text{-CD5-PE-Cy5}$ y $\alpha\text{-CD31-Alexa-Fluor}^{\text{®}}647$. Tras el análisis por citometría de flujo, se acotaron las distintas poblaciones acorde a la expresión de CD5 y CD19 analizándose, para cada una de ellas, la unión de rh-EFNA4-Fc. La población CD5⁺CD19⁻ contenía la mayoría de células CD31⁺ de alta expresión analizándose la unión de la rh-EFNA4-Fc tanto en la población CD31⁺ como en la CD31⁻. Esto se realizó con los 2 ganglios procedentes de pacientes de LLC (LLC-GL) de los que se disponía. Se muestra un experimento representativo. En una tinción aparte se determinó que la población CD5⁺CD19⁻ correspondía mayoritariamente a células CD3⁺.

El análisis por inmunofluorescencia en las linfadenopatías habían puesto de manifiesto una fuerte expresión de EphA2 en las estructuras vasculares CD31⁺ (Figura 22), por lo que este receptor parecía ser el principal responsable de la unión de EFNA4-Fc en los ensayos de citometría de flujo (Figura 23). No obstante, analizamos mediante RT-PCR la posible expresión de otros receptores EphA en células endoteliales CD31⁺ enriquecidas a partir de suspensiones celulares de las linfadenopatías como de las obtenidas de ganglios linfáticos “sanos” (reactivos o centinela), usados como control (Figura 24). En todos los casos analizados se pudo constatar que EphA2 era el receptor más abundante, especialmente en LLC, pero también se encontró expresión de EphA3, EphA4, EphA5 ó EphA8, si bien más débilmente. Otros receptores EphA no se expresaban en los casos estudiados como EphA1, incluido en este análisis a pesar de que su afinidad está restringida a EFNA1, ó EphA7.

Figura 24. Análisis de expresión de ARNm para receptores EphA en las células endoteliales de ganglios linfáticos. Suspensiones celulares de los distintos ganglios linfáticos, 3 LLC-GL, 2 R-GL y 2 GL, se sometió a esta suspensión celular a un enriquecimiento negativo de CD2, CD5, CD19, CD13 y CD14, y positivo de CD31, alcanzando la población endotelial de interés, al menos, una pureza del 95%. Las parejas de cebadores utilizadas en este análisis de expresión se pueden encontrar en Anexos IV. E, célula endotelial. R, reactivo.



Al comparar la presencia de estructuras vasculares EphA2⁺ en ganglios LLC con la presencia en el resto de ganglios analizados se observó que eran más abundantes en los primeros (Figura 25 A). Por otra parte, en uno y otro caso, la morfología de la mayoría de los vasos EphA2⁺ podían corresponderse por su morfología de endotelio alto, con las llamadas vénulas post-capilares de endotelio alto (HEV, *High Endothelial Venules*), que representan “ventanas” de entrada/salida selectiva de linfocitos recirculantes a través de tejidos linfoides (Figura 25 B).

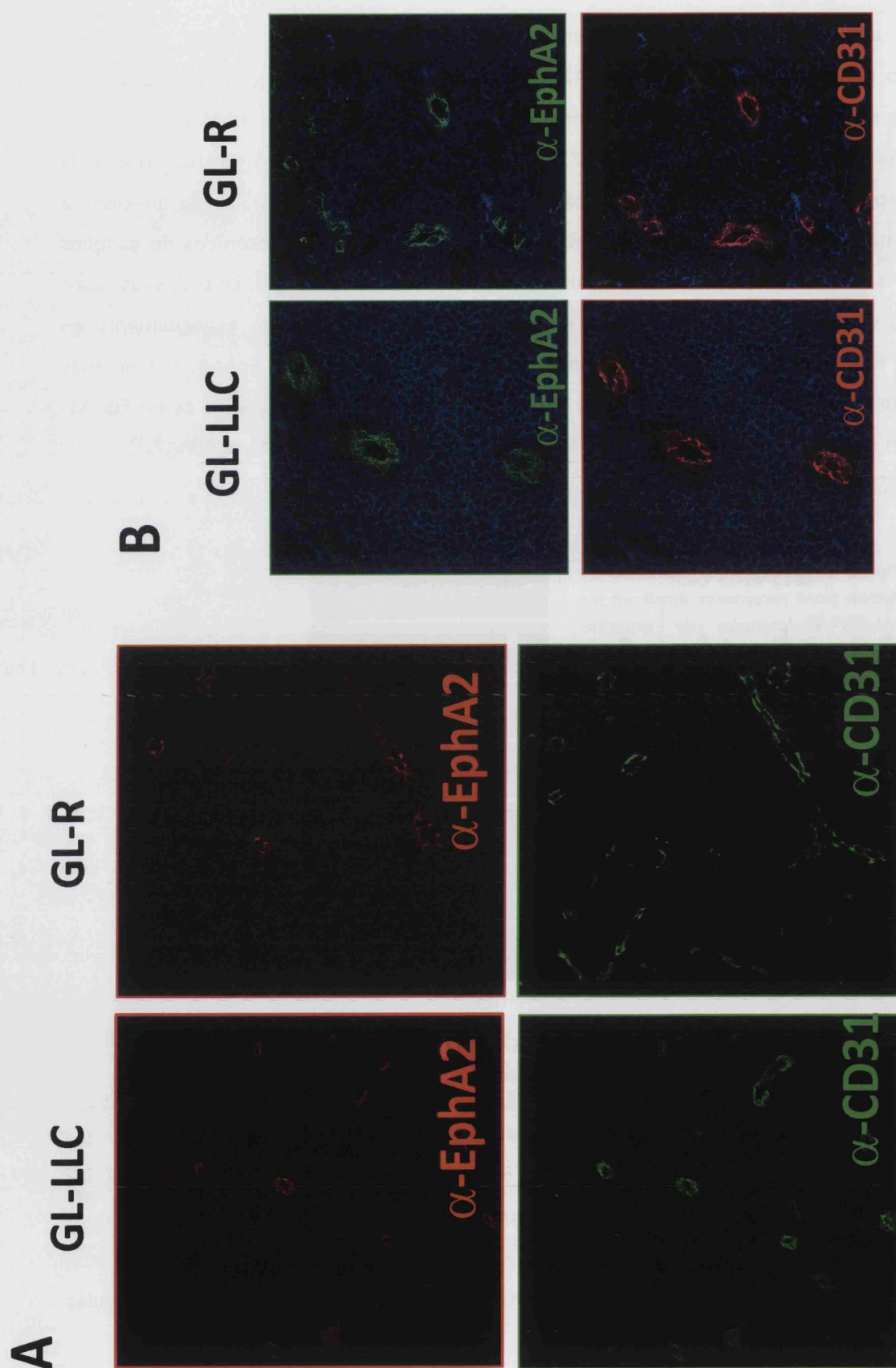


Figura 25. Los endotelios vasculares CD31+ de las linfadenopatías LLC (GL-LLC) sobreexpresan EphA2 en relación a ganglios activados reactivos (G-R). Crio secciones de 8 μ m de grosor de linfadenopatías LLC (GL-LLC) o ganglios control (ganglio reactivo, GR) se incubaron con (A) α -EphA2 + α -cabra-Alexa-Fluor[®]546 (rojo), α -CD31-Alexa-Fluor[®]488 (verde) o (B) α -EphA2 + α -cabra-Alexa-Fluor[®]546 (rojo), α -CD31-Alexa-Fluor[®]488 (verde). Las imágenes de fluorescencia fueron adquiridas en un microscopio confocal (Leica TCS-SP2 AOBs). (A) Objetivo 20x multi-inmersión NA 1.20; (B) Objetivo de inmersión en aceite 63x, 1.40 NA.

Todas estas evidencias sugerían que la interacción EphA2-EFNA4 podría mediar en el proceso de TEM de las B-LLC, determinando en cierta forma su entrada y/o salida de tejidos linfoides y, consiguientemente, su diseminación a estos territorios, un aspecto de la mayor relevancia en la evolución de esta enfermedad.

2.2.- Caracterización de células endoteliales y LLC utilizadas en el estudio de TEM

Con el fin de abordar el estudio de la capacidad de TEM de las células B-LLC *in vitro* se emplearon HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), las cuales habían sido utilizadas en estudios previos de TEM en LLC (*Takeuchi y Katayama, 1993*), representando no obstante un modelo comúnmente aceptado en este tipo de ensayos (*Dunon y cols., 1996; Aurrand-Lions y cols., 2002; Imhof y Aurrand-Lions, 2004; Luster y cols., 2005*). Para ello, se determinó previamente si las características de las HUVEC, en cuanto a expresión de EphA y su capacidad de ligar EFNA4, podían asemejarse a lo observado en las células endoteliales aisladas de adenopatías.

Para evaluar estos aspectos, monocapas de HUVEC fueron estimuladas durante 6-8 horas o durante toda la noche con TNF- α , con el fin de inducir condiciones inflamatorias en este sistema *in vitro*, siguiendo el modelo comúnmente utilizado en los ensayos de TEM (*Dunon y cols., 1996; Aurrand-Lions y cols., 2002; Imhof y Aurrand-Lions, 2004; Luster y cols., 2005*). Además de confirmar por citometría de flujo (no mostrado) que estas condiciones de cultivo de HUVEC inducían un incremento de expresión de moléculas relacionadas con TEM tan importantes como ICAM-1 (CD54) y VCAM-1 (CD106), algo ya conocido en este modelo *in vitro*, se observó que tras la estimulación con TNF- α , las HUVEC presentaban una fuerte expresión de EphA2 (*Figura 26 A*), confirmando datos previos (*Pandey y cols., 1995*), y unían fuertemente EFNA4-Fc (*Figura 26 A*). La mayoría de las células de interés (95,86%), definidas como CD31⁺CD54⁺, expresaban EphA2 y eran capaces de unir la proteína recombinante. Este estudio se completó mediante análisis de microscopía confocal (*Figura 26 B*). La monocapa endotelial formada por HUVEC se cultivó con EFNA4-Fc, para la posterior inmunodetección de EphA2 y de EphA4, otro receptor mayoritariamente expresado por HUVEC observado en el análisis de RT-PCR (datos no mostrados). En estas condiciones de cultivo, se observó que la mayoría de EFNA4-Fc estaba unida a EphA2, mientras que apenas se detectó la proteína recombinante unida a EphA4.

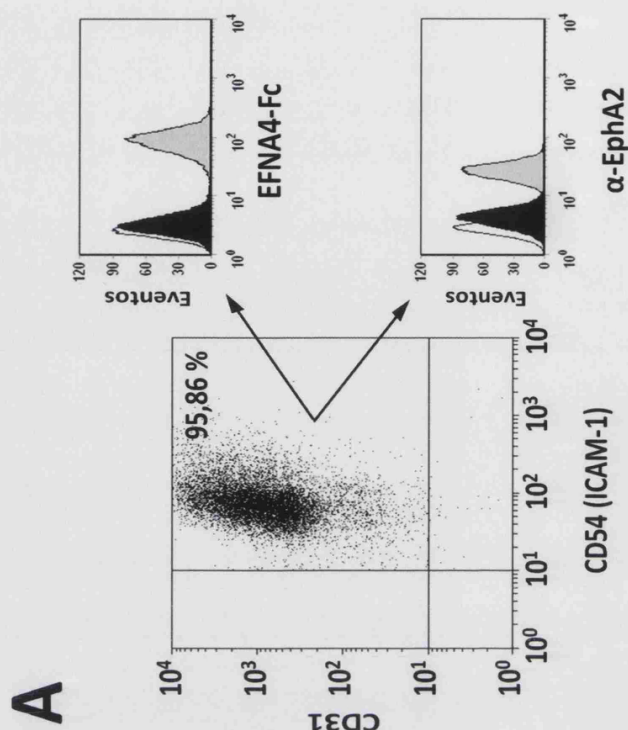
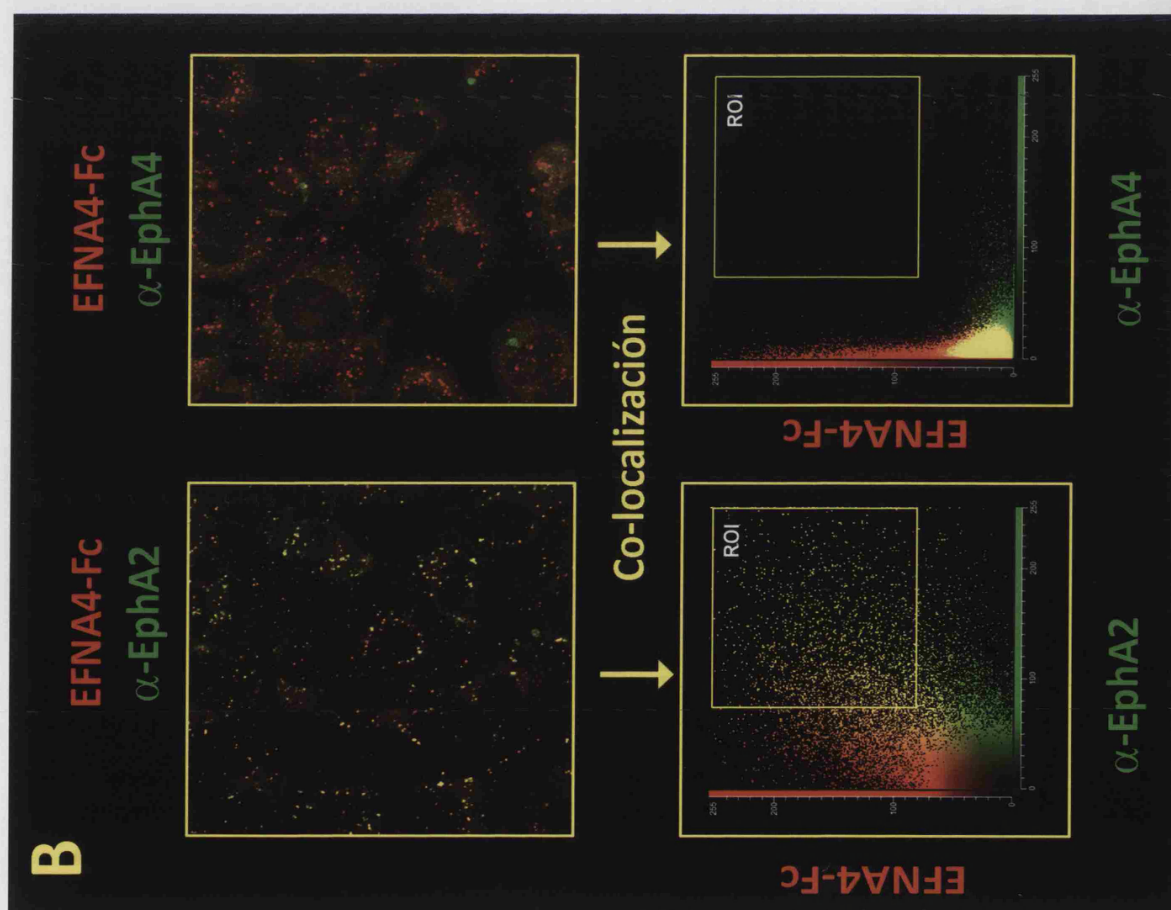


Figura 26. Las células endoteliales HUVEC estimulas con $TNF-\alpha$ unen $rhEFNA4-Fc$ a través de EphA2 . A) Suspensiones celulares de células HUVEC crecidas en monocapa y estimuladas con $TNF-\alpha$ se incubaron con EFNA4-Fc + α -Hist-FITC, cabra- α -h-EphA2 + α -cabra-Alexa-Fluor[®]488, α -CD54-PE-Cy5 y α -CD31-Alexa-Fluor[®]647, y se analizaron mediante citometría de flujo. (Tinciones control: blanco, h-Fc + SAV-Alexa-Fluor[®]488; negro, h-Fc + cabra-IgG + α -cabra-Alexa-Fluor[®]488). **B)** Monocapas de HUVEC estimuladas con $TNF-\alpha$ se incubaron con EFNA4-Fc (EFNA4-Fc + α -Hist-b + SAV-Alexa-Fluor[®]546; rojo), durante 60 minutos. Tras su fijación con paraformaldehído al 4% se incubaron con α -EphA2 ó α -EphA4 y anticuerpos secundarios α -especie-Alexa-Fluor[®]488 (verde). Para el análisis de co-localización de los agregados EFNA4-Fc (rojo) y EphA2 ó EphA4 se crearon gráficos bidimensionales de co-localización, analizándose las coincidencias en regiones de interés (ROI). Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal (Leica TCS-SP2 AOBs, objetivo de inmersión en aceite, 63X, 1.40 NA).



2.3.- Parámetros clínicos de los pacientes

La posible implicación de Eph/EFN en la migración de las células B-LLC se valoró con un grupo representativo de pacientes con LLC, cuyas características clínicas se reflejan en la *Tabla 9*. Nueve hombres y cuatro mujeres formaron este grupo de pacientes, cuya media de edad era de 71,7 años. Los pacientes se distribuyen homogéneamente tanto en los diferentes grupos de riesgo, bajo (4), intermedio (4) y alto (5), como en la presencia/ausencia de adenopatías, siete frente a seis. La cantidad media de hemoglobina (Hb) presentada por los pacientes es de 11,2 g/dL, por debajo del intervalo de normalidad para esta proteína (13,0 - 17,5 g/dL).

Muestra	Edad	Sexo	Riesgo	Linfoadenopatía	Hb (g/dL)	Recuento leucocitario ($\times 10^9/L$)	Citogenética	CD38 (%)	ZAP-70 (IMF)	EFNA4 (IMF)
B-LLC-SP-1	65	M	Bajo	No	12,3	128	Normal	21	10,23	37,23
B-LLC-SP-2	75	F	Bajo	No	14,2	201	del(13q14)	1	6,63	32,58
B-LLC-SP-3	83	M	Bajo	No	11,6	65	ND	5	8,23	52,36
B-LLC-SP-4	62	M	Bajo	No	13,5	45	del(13q14)	0	45,23	65,56
B-LLC-SP-5	76	M	Int.	Sí	11,5	66	+12	23	21,23	14,95
B-LLC-SP-6	54	F	Int.	Sí	13,2	32	del(13q14)	15	36,23	15,23
B-LLC-SP-7	78	F	Int.	Sí	11,21	121	del(13q14)	1	8,65	19,98
B-LLC-SP-8	89	M	Int.	Sí	14,5	96	del(13q14)	0	49,23	23,75
B-LLC-SP-9	59	M	Alto	Sí	9,32	85	Normal	32	6,60	25,56
B-LLC-SP-10	66	M	Alto	Sí	8,9	55	del(13q14)	3	9,63	12,65
B-LLC-SP-11	71	M	Alto	Sí	9,1	206	+12	6	26,69	35,62
B-LLC-SP-12	91	M	Alto	No	7,8	144	del(17p13)	25	65,98	36,26
B-LLC-SP-13	63	F	Alto	No	8,5	85	del(13q14)	0	5,63	25,63

Tabla 9. Tabla Pacientes: Características Clínicas. Enriquecidas las muestras tras la centrifugación diferencial se analizaron los parámetros de CD38, ZAP-70 y EFNA4, mediante citometría de flujo, usando para ello los anticuerpos correspondientes. IMF, Intensidad Media de Fluorescencia. Los datos clínicos, edad, sexo, riesgo, presencia de linfoadenopatías, hemoglobina (Hb), recuento leucocitario y análisis citogenético, fueron facilitados por el hospital de procedencia de las muestras. **M:** masculino, **F:** femenino, **ND:** no determinado, **+**: duplicación, **del:** delección.

La media de leucocitos contabilizados en sangre ($100,23 \times 10^9/L$), resultó 10 veces mayor del límite superior de los parámetros normales ($4,00-10,00 \times 10^9/L$), habiendo pacientes que superaban en 20 veces este límite. La citogenética disponible para doce de estos pacientes revelaba que ocho de ellos presentaban delecciones, siete en el brazo largo del cromosoma 13 (del(13q14)) y uno en el brazo corto del cromosoma 17 (del(17p13)), delección que comprendía al gen supresor de tumores *p53*; y que dos de ellos mostraban una trisomía

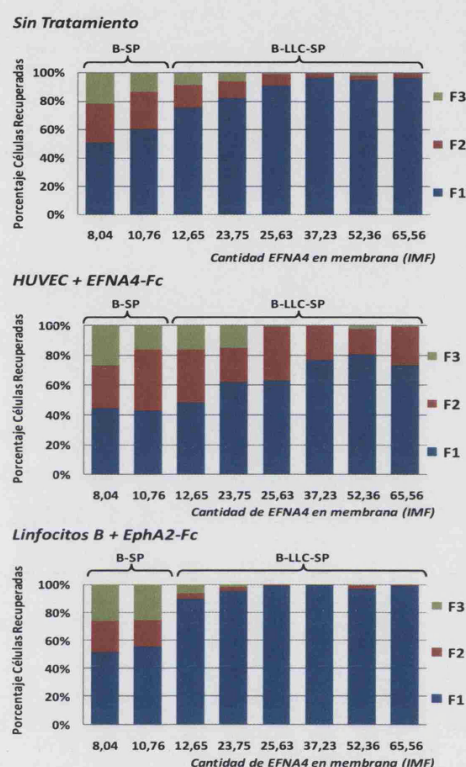
del cromosoma 12 (+12), mientras que otros dos presentaban un cariotipo normal. Otros factores pronóstico que se han relacionado más recientemente con el pronóstico de esta enfermedad son la expresión de CD38 y de ZAP-70 (Zupo y cols., 1996; Damle y cols., 1999; Rosenwald y cols., 2001; Crespo y cols., 2003). Respecto al primer factor, tan sólo cinco de los pacientes evaluados mostraron un porcentaje de células CD38⁺ mayor al 10%, con una media de 23,2%. Respecto al segundo, los pacientes mostraron una cantidad de ZAP-70 heterogénea, determinada por citometría de flujo, comprendiéndose en un intervalo de 5,63 a 65,98 IMF y 23,09 IMF de media. Las muestras seleccionadas para este estudio diferían en la cantidad de EFNA4 expresada en membrana con media de 30,57 IMF y mediana de 25,63 IMF, y con un mínimo de 12,65 IMF y un máximo de 65,56 IMF.

2.4.- La Migración Trans-Endotelial (TEM) de las células B-LLC a través de la monocapa de HUVEC está mediada por la interacción EphA2-EFNA4

Como primera aproximación al posible papel de la interacción EphA2-EFNA4 en la TEM de B-LLC, se realizaron ensayos para evaluar la capacidad de trans migración de estas B-LLC, en comparación con la mostrada por los B-SP. Sobre la monocapa endotelial, previamente estimulada mediante TNF- α , se co-cultivaron durante 2 horas, linfocitos B, B-SP y B-LLC-SP. Los diferentes tipos de lavado realizados en estos ensayos permitieron discriminar entre lo no adherido, F1, lo adherido, F2, y lo transmigrado, F3 (Figura 27). Estos ensayos de trans migración se realizaron con 6 muestras B-LLC-SP, las cuales diferían en la cantidad de EFNA4 expresada en membrana, y 2 muestras B-SP, en las cuales también se valoró la cantidad de EFNA4 (Tabla 9).

Los resultados correspondientes a estos ensayos mostraban porcentajes menores de células adheridas (F2) y transmigradas (F3) en B-LLC-SP que en B-SP. Porcentajes que en B-LLC-SP disminuían progresivamente a medida que aumentaba la expresión de EFNA4 en membrana, encontrándose una alta correlación negativa (F2, $r = -0,844$ y F3, $r = -0,752$). Complementariamente existía correlación entre las células no adheridas (F1) y la cantidad de EFNA4 encontrada en cada una de las muestras, en este caso positiva (F1, $r = 0,815$).

Para determinar la importancia de este papel, se trataron separadamente las HUVEC con EFNA4-Fc y las células B, con EphA2-Fc, bloqueando así las posibles interacciones heterotípicas EphA2-EFNA4 entre ambos tipos celulares, a la vez que se podría inducir señalización en cada uno de ellos.



Muestra	EFNA4 (IMF)	F	Sin tratamiento	HUVEC + EFNA4-Fc	Células B + EphA2
B-SP-1	8,04	F1	50,94 ± 0,08	44,78 ± 1,08*	51,73 ± 0,37
		F2	27,25 ± 0,35	28,51 ± 0,7	22,43 ± 0,61*
		F3	21,8 ± 0,43	26,72 ± 0,38+	25,85 ± 0,23+
B-SP-2	10,76	F1	60,59 ± 0,56	43,17 ± 0,25#	55,62 ± 0,54*
		F2	26,45 ± 0,61	40,9 ± 0,15#	18,89 ± 0,16#
		F3	12,95 ± 0,05	15,94 ± 0,1#	25,5 ± 0,7#
B-LLC-SP-10	12,65	F1	75,49 ± 0,42	48,35 ± 0,85#	89,24 ± 0,16#
		F2	16,1 ± 0,21	35,83 ± 0,58#	4,32 ± 0,02#
		F3	8,41 ± 0,21	15,82 ± 0,27#	6,45 ± 0,18*
B-LLC-SP-8	23,75	F1	82,62 ± 2,13	62,32 ± 1,54+	95,12 ± 0,95*
		F2	11,29 ± 1,47	22,68 ± 0,45+	3,11 ± 0,64*
		F3	6,1 ± 0,66	15 ± 1,09*	1,78 ± 0,3*
B-LLC-SP-13	25,63	F1	90,83 ± 0,12	63,23 ± 0,16#	98,98 ± 0#
		F2	8,26 ± 0,09	35,9 ± 0,14#	1,01 ± 0,01#
		F3	0,91 ± 0,03	0,88 ± 0,02	0,02 ± 0,01#
B-LLC-SP-1	37,23	F1	96,49 ± 0,11	76,91 ± 0,1#	99,21 ± 0,03#
		F2	3,35 ± 0,05	22,94 ± 0,09#	0,78 ± 0,04#
		F3	0,16 ± 0,05	0,16 ± 0,01	0,02 ± 0,01
B-LLC-SP-3	52,36	F1	94,66 ± 0,91	80,73 ± 1,46+	96,58 ± 0,31
		F2	3,72 ± 0,38	17,1 ± 1,2#	2,6 ± 0,07
		F3	1,63 ± 0,53	2,17 ± 0,25	0,82 ± 0,24
B-LLC-SP-4	65,56	F1	96,47 ± 0,25	73,35 ± 0,15#	98,93 ± 0,08+
		F2	3,2 ± 0,26	26,21 ± 0,15#	1,06 ± 0,08+
		F3	0,32 ± 0,01	0,45 ± 0#	0 ± 0#

Figura 27. Los tratamientos con EphA2-Fc y EFNA4-Fc modifican la TEM linfocito-endotelio. Monocapas de HUVEC fueron tratadas con TNF- α (10 ng/mL) durante la noche, siendo retirada esta citocina al menos 2 horas antes del co-cultivo con 3×10^5 linfocitos B, -LLC o -SP pre-teñidos con CFSE, manteniéndose este co-cultivo durante 2 horas. Mediante un primer lavado, suave pero exhaustivo, con medio RPMI a temperatura 37° se recogió la fracción de células B no adheridas a monocapa (F1). El siguiente lavado se realizaba con PBS-EDTA a 37 °C durante 7 minutos, recuperando en esta segunda fracción las células B adheridas a monocapa (F2). A continuación se realizó un último lavado en RPMI-Tripsina durante 10 minutos, tras los cuales se recuperaba, junto con las células HUVEC, las células B que habían migrado a través de éstas (F3). Tras este último lavado la placa de ensayo era examinada al microscopio para asegurar que cada pocillo había sido recogido en su totalidad. Los tratamientos a estudiar, EFNA4-Fc sobre HUVEC y EphA2-Fc sobre células B, se realizaron antes del co-cultivo. Las células B recuperadas se contabilizaron mediante citometría de flujo y microesferas de conteo. Estos ensayos se realizaron con 3 muestras B-SP y con B-LLC-SP-1, -3, -4, -8, -10 y -13, que presentaban diferentes cantidades de EFNA4 en membrana (Tabla 9). Cada uno de los supuestos se realizó por triplicado. El número de células recuperadas en cada fracción se normalizó al absoluto de células recuperadas ($F_n = F_1 + F_2 + F_3$). La significación estadística de las diferencias de medias se llevó a cabo mediante T-Student para muestras pareadas entre los diferentes grupos, con y sin tratamientos. Las diferencias se representan en base al valor de su significación estadística * $p < 0,05$; + $p < 0,01$; # $p < 0,005$.

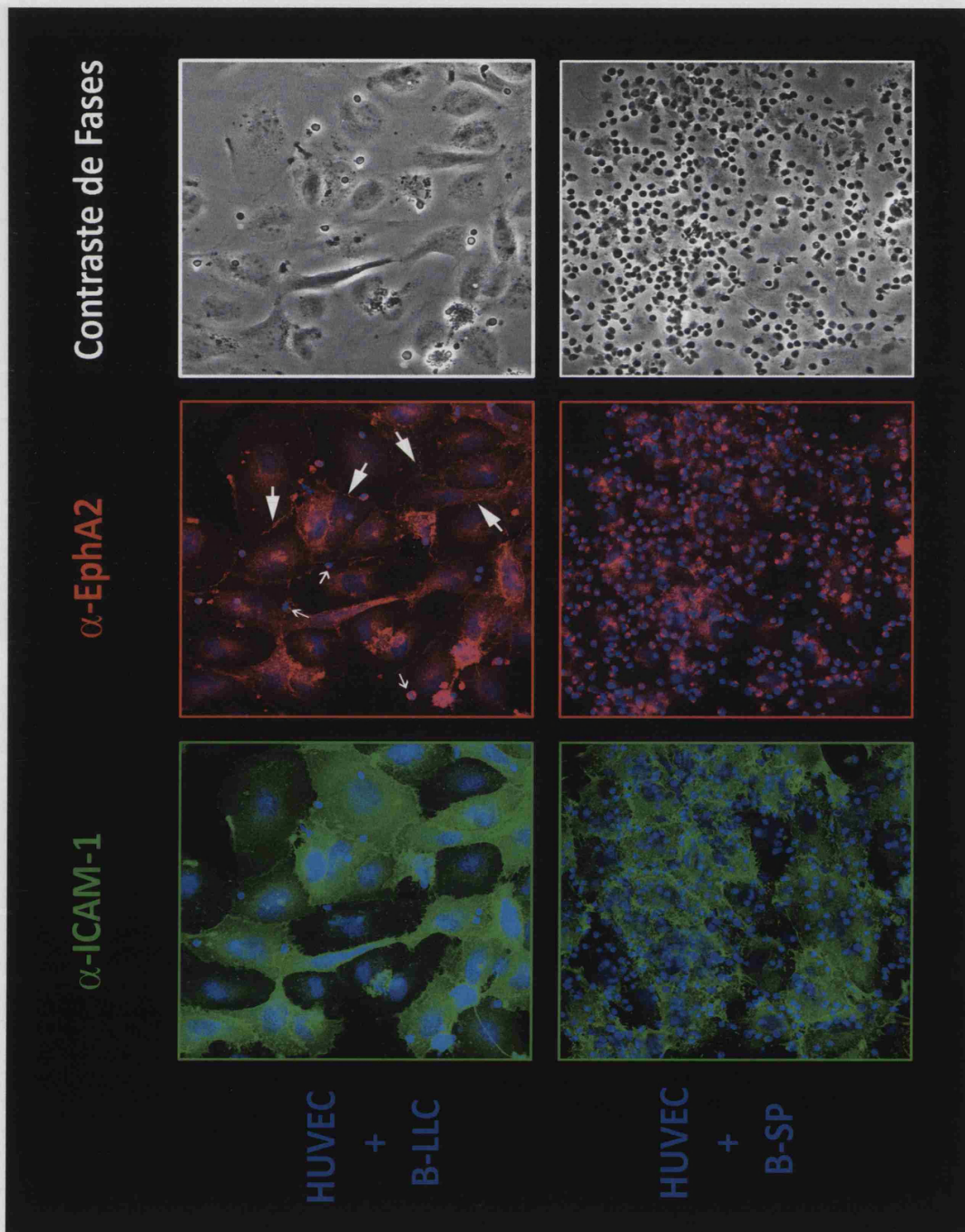
El pre-tratamiento con EFNA4-Fc a HUVEC conducía a un incremento significativo, en la mayoría de los casos, del porcentaje de células adheridas (F2) y el de las transmigradas (F3) (*significaciones estadísticas indicadas en la Tabla 33*), disminuyendo por tanto el porcentaje de las no adheridas (F1), tanto para B-LLC-SP, como para B-SP.

El tratamiento con EphA2-Fc provocaba diferentes efectos, dependiendo de la procedencia del linfocito B al que fue suministrado. En B-SP el porcentaje de células no adheridas (F1) se mantuvo constante, mientras que el de transmigradas (F3) aumentó significativamente, siendo en este caso el porcentaje de células adheridas (F2) el que se vio reducido. Mientras en B-LLC-SP, tanto el porcentaje de células adheridas (F2) como el de transmigradas (F3) se vieron notablemente reducidos, experimentando el porcentaje de no adheridas (F1) un incremento significativo.

Estos resultados sugerían que la interacción EphA2-EFNA4 mediaba en el proceso de TEM a través de HUVEC indicando que la ausencia de esta interacción no afectaba por igual a los resultados dependiendo de si se el pre-tratamiento era el de EphA2-Fc sobre las células B o el de EFNA4-Fc sobre el endotelio. Además, mientras el tratamiento con EFNA4-Fc sobre las HUVEC resultaba en un incremento en la TEM de ambos tipos de células B, el pre-tratamiento con EphA2-Fc sobre linfocitos B sanos no resultaba en un cambio significativo que, por el contrario, en células B-LLC provocaba una reducción aún mayor, tanto del porcentaje de células adheridas como del de extravasadas.

Ensayos similares se llevaron a cabo para analizar, mediante inmunofluorescencia, la posible localización de EphA2 en los contactos entre células B, sanas o LLC, y HUVEC. Tras 2 horas de co-cultivo, el número de células B adheridas y/o transmigradas que permanecían tras el lavado de los cultivos, resultó muy diferente dependiendo de la procedencia de la muestra (*Figura 28*), de acuerdo con los ensayos de TEM previos (*Figura 27*). En estos ensayos se podía apreciar que la expresión de EphA2 de las células endoteliales se redistribuía, concentrándose en los contactos con las células B (*ver flechas Figura 28*), lo cual apoyaba la hipótesis de un posible papel de la interacción EphA2-EFNA4 en las adhesiones entre estos tipos celulares.

Figura 28. Células B-LLC muestran una pobre adhesión a HUVEC comparado con células B sanas. Monocapas de HUVEC creadas en portaobjetos de vidrio tratados con fibronectina y estimuladas durante 12 horas con TNF- α , se co-cultivaron con 3x10⁵ células B-LLC-SP o B-SP durante 2 horas. Las células no adheridas se retiraron mediante lavado con medio de cultivo (37°C), y los cultivos se fijaron con paraformaldehído al 4%. Inmunodetección: α -EphA2 (rojo), α -ICAM-1 (verde); núcleos celulares (azul); contraste de fases (grises). Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal espectral Leica TCS-SP2 AOBs (objetivo de inmersión en aceite, 20X, 1.20 NA). EphA2 se relocaliza desde los contactos (cabeza flecha) entre endoteliales a los contactos con células B (flechas). En imágenes de contraste de fases las células migradas se observan más oscuras.



2.5.- La adhesión de células B-LLC a HUVEC es significativamente menor que la de Bs sanos, lo cual está directamente relacionado con la expresión de EFNA4

Uno de los aspectos a considerar en la TEM es la adhesión entre los dos tipos celulares implicados. Para valorar este aspecto, se realizaron ensayos de conjugados linfocito-endotelio en los que, mediante citometría de flujo, se determinó la proporción de agregados linfocito-endotelio como “población” doble positiva gracias a la tinción fluorescente de membrana utilizada de forma diferencial para discriminar ambos tipos celulares.

Los resultados de estos ensayos mostraron que el porcentaje de células B-LLC conjugadas era significativamente menor ($8,58 \pm 3,76$) que el de B-SP ($27,27 \pm 4,39$; *Figura 29 A*), indicando que las B-LLC tenían alterada su capacidad de adhesión a endotelios, algo que no había sido firmemente demostrado con anterioridad aunque sugerido de forma indirecta (*Stauder y cols., 1993; Chen y cols., 1999; Gu y cols., 2001*).

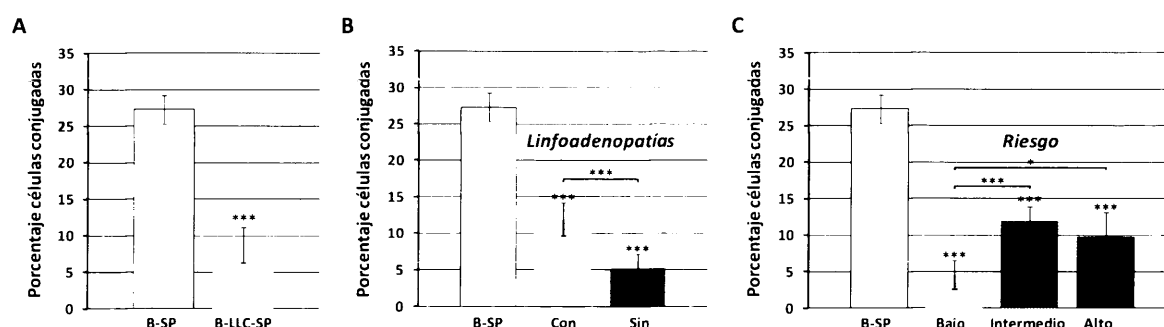


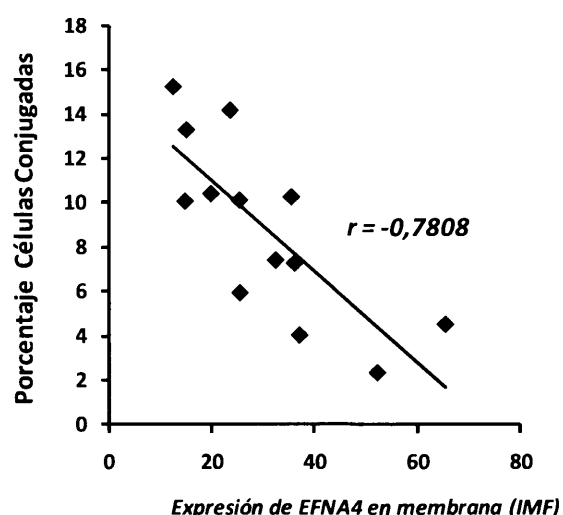
Figura 29. Los B-LLC-SP presentan menor capacidad de formar conjugados con HUVEC. 5×10^4 HUVEC y 2×10^5 células B, previamente teñidas con PKH26 y CFSE, respectivamente, se co-cultivaron durante 60 minutos en agitación. Las adhesiones acontecidas se fijaron para su análisis, mediante citometría de flujo. **A)** Los gráficos reflejados se corresponden con 3 muestras B-SP y 13 muestras B-LLC-SP. **B)** Adhesión en base a la presencia/ausencia de linfoadenopatías, quedando el primer grupo representado por 7 pacientes y por 6 el segundo. **C)** Adhesión de acuerdo a grupos de riesgo: 4 de bajo, 4 de Intermedio y 5 de alto. Las diferencias entre medias se evaluaron mediante estadístico T-Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; y *** $p < 0,005$).

Posteriormente, comparamos los resultados obtenidos agrupando las muestras de pacientes en base a sus parámetros clínicos como la presencia/ausencia de linfoadenopatías (*Figura 29 B*) y el estadio de riesgo en el que se encontraban cada uno de los pacientes evaluados (*Figura 29 C*) observándose diferencias significativas en su capacidad de adhesión. Así, las muestras provenientes de pacientes con linfoadenopatías presentaban un mayor porcentaje de conjugados, alrededor de un 12%, que las de los pacientes sin esta patología,

en torno a un 5% ($p < 0,005$; *Figura 29 B*). Atendiendo al estadio de riesgo de los pacientes, las muestras procedentes del grupo de riesgo bajo presentaban un porcentaje de conjugados significativamente menor ($4,55 \pm 1,96\%$) que el porcentaje presentado por la muestras de riesgo intermedio ($11,99 \pm 1,93\%$, $p < 0,005$) y alto ($9,76 \pm 3,40\%$, $p < 0,05$); mientras que entre estos dos últimos grupos no existían diferencias significativas (*Figura 29 C*; $p > 0,05$).

Dado que un objetivo de nuestro estudio era el de determinar si la sobreexpresión de EFNA4 podría relacionarse con la TEM de las B-LLC y dado que, como habíamos observado previamente, la expresión de EFNA4 en membrana podía relacionarse con los parámetros clínicos comentados (linfadenopatía, *Tabla 8 B*, y estadio de riesgo Rai, *Figura 17 B*), se exploró la posibilidad de que la cantidad de EFNA4 expresada en membrana también pudiera estar relacionada con la capacidad de adhesión al endotelio (*Figura 30*). El análisis del porcentaje de conjugados frente a la cantidad de EFNA4 expresada en membrana para cada una de las muestras B-LLC-SP analizadas (*Tabla 9*), indicaba la existencia de una correlación negativa ($r = -0,7808$, $p < 0,001$) entre ambos parámetros, a mayor cantidad de EFNA4, menor capacidad de adhesión a HUVEC.

Figura 30. Las B-LLC-SP presentan menor capacidad de formar conjugados a medida que la expresión de EFNA4 en membrana es mayor. Los datos de conjugados B/HUVEC se representaron en base a la cantidad de EFNA4 encontrada en membrana en las muestras B-LLC, determinada mediante citometría de flujo (*Tabla 9*). La correlación se determinó mediante el coeficiente de correlación de Pearson ($p < 0,001$).



Nuevamente, con el fin de determinar una posible función de la interacción EphA2-EFNA4 en estos ensayos de adhesión, los experimentos de conjugados se realizaron pre-incubando células B-LLC o B-SP con la proteína recombinante EphA2-Fc, y las HUVEC con EFNA4-Fc (*Figura 31*). El tratamiento con EphA2-Fc provocó, en la mayoría de las muestras

evaluadas, una disminución del porcentaje de conjugados relativo a su control, aunque la reducción se produjo en diferentes grados dependiendo de la procedencia de la muestra tratada. Sobre muestras B-SP, el tratamiento provocó una tímida disminución, con un promedio de $0,89 \pm 0,11$ respecto al control, mientras que en muestras B-LLC-SP la reducción fue mucho mayor, con un promedio de $0,26 \pm 0,15$ relativo al control, encontrando diferencias significativas entre los dos grupos de muestras ($p < 0,005$). Al agrupar los resultados en base al grupo de riesgo al que pertenecen los pacientes, se observó que los de riesgo intermedio presentaban la mayor reducción, $0,21 \pm 0,09$, seguidos de los riesgo bajo, $0,25 \pm 0,10$, mientras que los de riesgo alto mostraban la menor reducción, $0,33 \pm 0,21$ a pesar de lo cual, no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos de riesgo ($p > 0,05$).

Basándonos en la correlación inversa encontrada anteriormente entre cantidad de EFNA4 y la capacidad de formar conjugados (*Figura 30*), los resultados de conjugados en presencia de tratamientos se analizaron nuevamente (*Figura 31*) pero atendiendo a la cantidad de EFNA4 (*Tabla 9*), encontrándose en los tratamientos con EphA2-Fc una reducción especialmente significativa entre las muestras que expresaban una alta cantidad de EFNA4 en su membrana ($0,13 \pm 0,03$) frente a las muestras con media y baja cantidad de EFNA4 en membrana, las cuales mostraron reducciones similares ($0,32 \pm 0,09$ y $0,29 \pm 0,18$, respectivamente). Las estadísticas realizadas entre estos grupos, baja, intermedia y alta cantidad de EFNA4, reflejaron que las muestras que presentan menor cantidad de EFNA4 en membrana, experimentaban una reducción significativamente menor ($p < 0,05$), a la experimentada por las muestras con cantidad intermedia; mientras que el resto de estadísticas entre los diferentes grupos B-LLC, en base a la cantidad de EFNA4 en membrana, no revelaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

Por otra parte, al analizar el tratamiento con EFNA4-Fc sobre HUVEC, se observó un aumento significativo en el porcentaje de conjugados, respecto al de su control sin tratar, en todas la muestras evaluadas, tanto para B-SP ($p < 0,005$) como para B-LLC-SP ($p < 0,01$), no encontrándose diferencias significativas ($p > 0,05$), entre B-SP ($1,77 \pm 0,21\%$) y B-LLC-SP ($1,81 \pm 0,41\%$), dentro de los diferentes grupos evaluados, ni para el riesgo de los pacientes, ni dentro de los grupos establecidos en base a la cantidad de EFNA4 en membrana (*Figura 31*).

El hecho de que los tratamientos enfocados a bloquear la interacción EphA2-EFNA4 pero aplicados de forma diferencial sobre endotelios o células B, B-LLC-SP o B-SP, provocara efectos aparentemente antagónicos, sugería que no sólo la interacción estaba siendo bloqueada sino que, presumiblemente, uno u otro tratamiento o los dos podían estar induciendo señalización hacia el tipo celular que los unía (señal de EphA2 hacia el endotelio o señal *forward* en HUVEC + EFNA4-Fc o señal de la EFNA4 hacia el linfocito B o señal *reverse* en el caso de células B + EphA2-Fc).

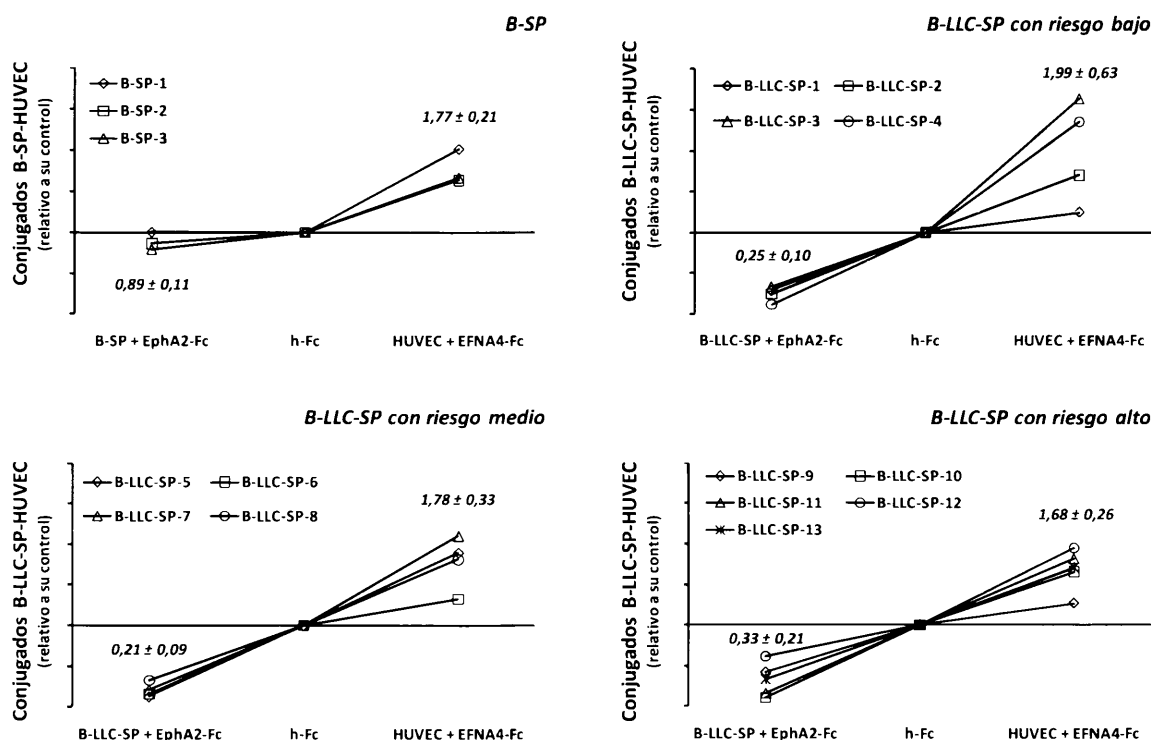


Figura 31. Los ensayos de conjugados se realizaron en base a lo descrito en la Figura 29. En esta nueva aproximación, además de pre-bloquear las células con fragmentos h-Fc, se pre-trataron separadamente, HUVEC con EFNA4-Fc, y células B, -LLC y -SP, con EphA2-Fc, previo al co-cultivo en suspensión. Los datos mostrados fueron normalizados a su correspondiente control sin tratar. Los resultados se muestran en base al grupo de riesgo al que pertenecen los pacientes.

2.6.- Papel autónomo de EFNA4 en la adhesión de células B-LLC a endotelio

La disminución en la capacidad de adhesión a endotelio en B-LLC-SP provocada por el tratamiento con EphA2-Fc sugería la posibilidad de que este tratamiento fuera capaz de modular la expresión y/o función de alguna o algunas de las moléculas de adhesión implicadas en el proceso de TEM y que algunos autores han relacionado con el tráfico de las

B-LLC (Jewell y Yong, 1997; Parfienczyk y cols., 2003; Eisterer y cols., 2004; Gattei y cols., 2008; Redondo-Munoz y cols., 2008).

Para ello, determinamos mediante citometría de flujo la expresión (IMF) de algunas de las principales moléculas de adhesión implicadas (Tabla 10) como CD62L, CD44, CD11a, CD18, CD49d y CD29. La media de las expresiones para las 13 muestras evaluadas (Tabla 10), reflejó diferentes intensidades de expresión (IMF) para cada una de ellas, siendo la molécula CD44 en la que se registró la expresión más alta (666,51 IMF), seguida de CD62L (528,73 IMF). Las expresiones de integrinas reflejaron una expresión más discreta, integrina VLA-4 (CD49d, 37,34 IMF) y CD29 (18,5 IMF) e integrina LFA-1 (CD11a, 17,28 IMF) y CD18 (26,57 IMF).

Muestra	CD62L (IMF)	CD44 (IMF)	CD11a (IMF)	CD18 (IMF)	CD49d (IMF)	CD29 (IMF)
B-LLC-SP-1	89,44	166,23	7,64	10,63	13,91	8,26
B-LLC-SP-2	18,96	144,93	14,98	15,46	45,06	14,01
B-LLC-SP-3	48,81	113,39	36,41	35,25	20,62	15,81
B-LLC-SP-4	121,52	929,44	14,62	22,73	29,89	11,60
B-LLC-SP-5	859,23	1376,01	24,48	79,77	133,06	15,40
B-LLC-SP-6	181,91	924,52	11,40	40,72	123,45	17,84
B-LLC-SP-7	583,33	741,23	32,12	74,90	20,33	12,39
B-LLC-SP-8	706,02	939,25	13,86	16,51	29,63	18,24
B-LLC-SP-9	562,23	725,23	10,67	9,83	20,25	13,27
B-LLC-SP-10	868,62	441,25	10,87	9,08	22,52	14,01
B-LLC-SP-11	444,02	333,25	13,58	10,32	12,48	18,84
B-LLC-SP-12	649,23	689,52	19,05	11,11	7,08	25,02
B-LLC-SP-13	1740,21	1140,32	14,97	9,10	7,20	55,85

Tabla 10. Expresión de las principales proteínas implicadas en adhesión de las B-LLC-SP. Mediante citometría de flujo, se determinó la IMF (Intensidad Media de Fluorescencia) de las distintas moléculas de adhesión en las muestras B-LLC-SP utilizadas en los ensayos de TEM y adhesión.

Atendiendo al estadio de riesgo de los pacientes (Tabla 9), se encontraron algunas correlaciones significativas con los niveles de expresión de CD62L, CD44 y CD18 pero no con el resto de moléculas de adhesión analizadas. La expresión de CD62L era significativamente menor en el grupo de bajo riesgo que en los grupos de riesgo intermedio ($p<0,05$) y alto ($p<0,05$); mientras que entre estos dos grupos no se apreciaban diferencias. La expresión de CD44 también resultó significativamente menor en el grupo de bajo riesgo respecto a la encontrada en el de riesgo intermedio ($p<0,05$). Una mayor expresión de CD18 se encontró en el grupo de riesgo intermedio, diferenciándose significativamente del de alto riesgo ($p<0,05$) y sensiblemente del de bajo. No existían, por tanto, una asociación clara entre los niveles de expresión de integrinas y el estadio de riesgo de los pacientes de acuerdo con

algunos autores (Vincent y cols., 1996; de la Fuente y cols., 1999; Bannerji y Byrd, 2000) ni con la capacidad de adhesión de las muestras B-LLC-SP a endotelios, estudiada en este trabajo (no mostrado). El análisis de correlación entre estas moléculas y EFNA4 no mostró significación estadística en general ($p > 0,05$) salvo para CD62L que se correlacionaba débilmente ($r = -0,48$; $p < 0,05$) y de forma inversa con la EFNA4, sugiriendo que la correlación entre EFNA4 y la adhesión diferencial a HUVEC de B-LLC-SP no estaba del todo relacionada con los niveles de expresión de estas moléculas.

Cabía la posibilidad, no obstante, de que los tratamientos con EFNA4-Fc pudieran modular la expresión de estas moléculas en las B-LLC-SP. Por ello, se evaluó si el tratamiento con EphA2-Fc modulaba la expresión de estas proteínas en B-LLC-SP tras haber sido cultivadas *in vitro* en presencia/ausencia de la proteína recombinante durante 1 hora (Figura 32). Los resultados obtenidos, apuntaban que el tratamiento no provocaba modulación en la expresión (IMF) de integrinas (CD11a, CD18, CD29, CD49d) o la selectina CD62L, mientras que la glicoproteína de membrana, CD44, sufrió una disminución en su expresión.

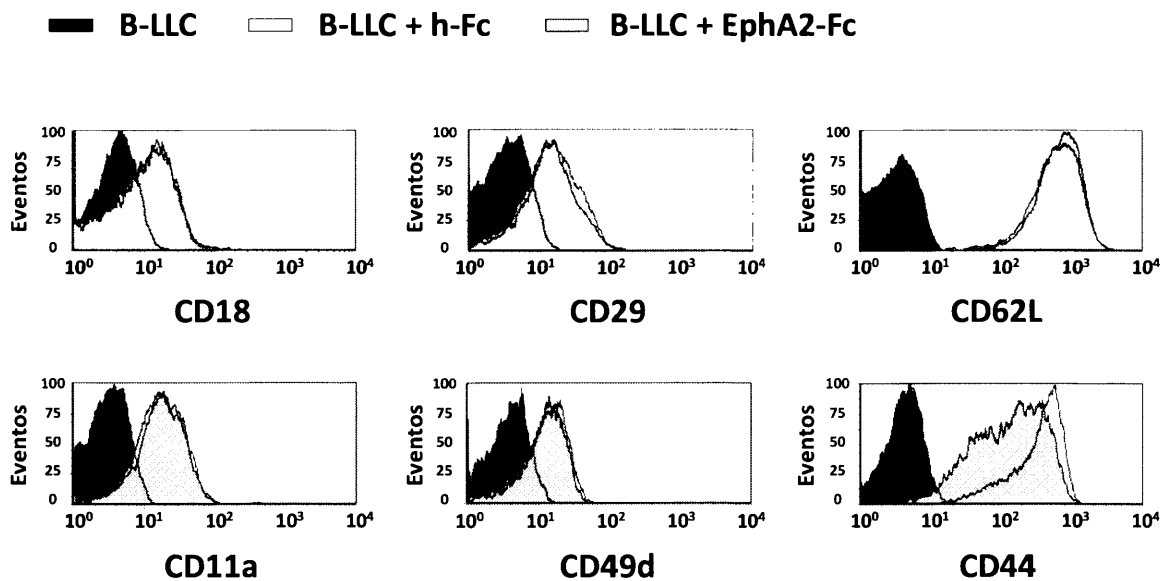


Figura 32. EphA2-Fc modula la expresión de CD44. A través de estos ensayos se evaluó la capacidad de EphA2-Fc para modular la expresión de las principales moléculas de adhesión en B-LLC-SP. Las B-LLC-SP-1, -3, -4, -5, -8, -10 y -13, fueron cultivadas durante 1 hora en ausencia (perfil blanco) o presencia (perfil gris) de EphA2-Fc. Tras el cultivo las células fueron teñidas con CD18, CD29, CD62L, CD11a, CD49d y CD44, cuya tinción se analizó mediante citometría de flujo con el pertinente control para cada tinción (perfil negro). En esta figura se muestra un ejemplo representativo.

Puesto que es sobradamente conocido que la función de integrinas es dependiente de su estado de activación más que de los niveles de expresión (*van der Flier y Sonnenberg, 2001*), valoramos si el tratamiento con EphA2-Fc era capaz de modular la adhesión de B-LLC-SP a distintos ligandos para estas moléculas como moléculas de matriz extracelular (FN, VN, LM y CL-I) y formas recombinantes de ICAM-1 y VCAM-1 (*Figura 33*).

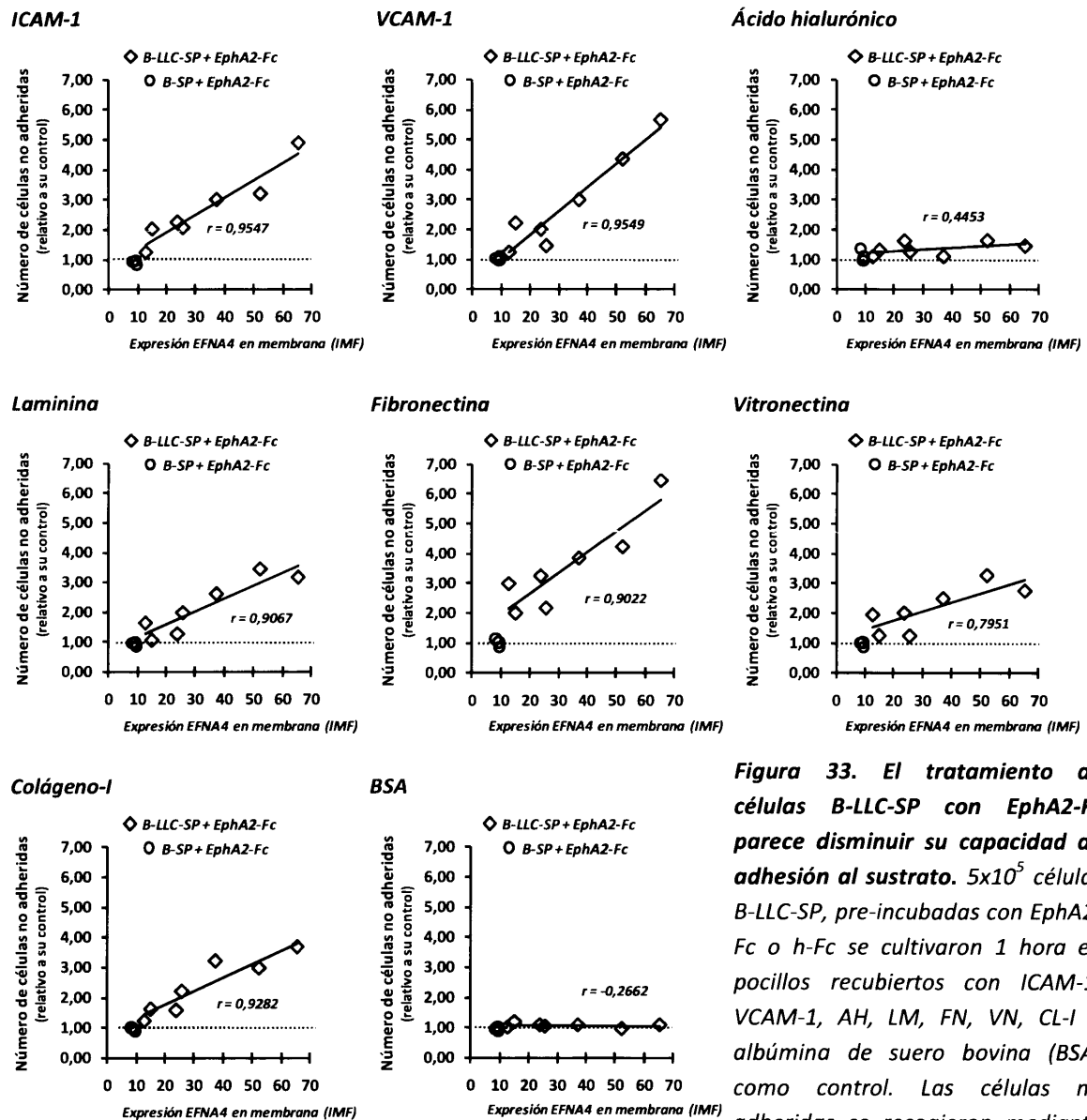


Figura 33. El tratamiento de células B-LLC-SP con EphA2-Fc parece disminuir su capacidad de adhesión al sustrato. 5×10^5 células B-LLC-SP, pre-incubadas con EphA2-Fc o h-Fc se cultivaron 1 hora en pocillos recubiertos con ICAM-1, VCAM-1, AH, LM, FN, VN, CL-I o albúmina de suero bovina (BSA) como control. Las células no adheridas se recogieron mediante aspiración, tras suave agitación y se

contabilizaron mediante citometría de flujo usando microesferas de conteo. El número de células tratadas con EphA2-Fc no adheridas, fue normalizado al número de células recuperadas tratadas con h-Fc. El efecto del tratamiento fue representado en base a la cantidad de EFNA4 encontrada en la membrana de cada una de las muestras evaluadas, determinada mediante citometría de flujo. La posible correlación existente se evaluó mediante el coeficiente de correlación de Pearson ($p < 0,005$). Cada uno de los supuestos se realizó por triplicado. Las muestras evaluadas fueron B-LLC-SP-1, -3, -4, -5, -8, -10 y -13; y 3 muestras B-SP.

Al evaluar los resultados obtenidos del tratamiento con EphA2-Fc, previamente normalizados al tratamiento control con h-Fc y enfrentarlos a la cantidad de EFNA4 expresada en la membrana de cada una de las muestras analizadas (*Figura 33*) se encontró, para la mayoría de los casos estudiados, una correlación positiva entre la cantidad de EFNA4 en membrana y el número de B-LLC no-adheridas. Cuando se usaron como sustrato las moléculas de adhesión, ICAM-1 y VCAM-1, se encontró una alta correlación, en torno a 0,955 para ambos casos, y un efecto del tratamiento muy notable, llegando a disminuir la adhesión hasta 4,9 y 5,67 veces, respectivamente, en la muestra que mayor cantidad de EFNA4 expresaba en membrana (B-LLC-SP-4).

Sin embargo, con el AH como sustrato, se obtuvo una correlación mucho más baja ($r = 0,4453$) al igual que el efecto encontrado con el tratamiento. El resto de sustratos evaluados mostraron altas correlaciones, especialmente FN, LM y CL-I, encontrándose en el primero de ellos, como consecuencia del tratamiento, la mayor reducción en la adhesión, de 6,47 veces. En contraste, las B-SP no experimentaban cambios significativos en su adhesión a los diferentes sustratos tras el tratamiento con la proteína recombinante.

Estos resultados permitían concluir que la disminución de la adhesión de las células B-LLC al endotelio tras tratamiento con EphA2-Fc era consecuencia de un papel autónomo de célula de EFNA4 sobre la funcionalidad de otras moléculas de adhesión implicadas en la TEM. Consiguientemente, la sobreexpresión de EFNA4 en las B-LLC podría responder a un proceso de repulsión mediado por altos niveles de expresión de esta molécula.

2.7.- EphA2-Fc inhibe la migración mediada por CCL19 de células B-LLC-SP

El papel de CCR7, CXCR4 y CXCR5 en la TEM de LLC había sido sugerido por algunos autores (*Till y cols., 2002; Burkle y cols., 2007; Ocana y cols., 2007*). Por tanto, se evaluó si la interacción EphA2-EFNA4 podría mediar en la TEM mediada por CCL19, CXCL12 ó CXCL13, nuevamente en presencia/ausencia de los tratamientos EphA2-Fc y EFNA4-Fc, sobre B-SP o B-LLC-SP y HUVEC, respectivamente (*Figura 34 A*).

Los resultados de los ensayos de TEM en ausencia de tratamiento con las proteínas recombinantes, mostraban que CCL19 inducía mayor migración de B-LLC-SP que CXCL12 (en torno a 1,5 veces) y CXCL13 (en torno a 3 veces) de acuerdo con otros autores (*Figura 34*) y, en cualquier caso, menor que los de B-SP. El pre-tratamiento con EphA2-Fc de las células B-LLC-SP provocó, con cualquiera de las quimiocinas evaluadas, una disminución significativa en el número de células migradas, reduciéndose a la mitad en presencia de CXCL12 y CXCL13, mientras que en presencia de CCL19 la reducción resultó mucho mayor, del orden de 14 veces. El pre-tratamiento con EFNA4-Fc sobre HUVEC no provocó las mismas consecuencias para todas las quimiocinas evaluadas al contrario de lo observado en el tratamiento con EphA2-Fc. En presencia de CCL19 el tratamiento incrementó significativamente el número de B-LLC-SP migradas, mientras que en presencia de CXCL12 y CXCL13 el mismo tratamiento redujo significativamente el número de células recuperadas, apuntando a una posible cooperación entre la señalización *forward* en HUVEC y CCL19. Para dilucidar si esta cooperación se producía tan sólo en el contexto de la enfermedad o también se producía en un contexto fisiológico, se realizaron ensayos de TEM con B-SP. Éstas mostraron la misma respuesta que sus análogos patológicos (*Figura 34 A*), mostrando una mayor TEM cuando las HUVEC habían sido pre-tratadas con EFNA4-Fc. Sin embargo, el pre-tratamiento con EphA2-Fc de los linfocitos sanos, no reducía significativamente el número de células migradas. Cuando el gradiente quimiotáctico empleado fue CXCL12 y CXCL13, las B-SP no experimentaron cambios significativos como consecuencia de los diferentes tratamientos (datos no mostrados).

Para comprobar si el papel inhibitorio sugerido por el tratamiento de EphA2-Fc a B-LLC-SP sobre la TEM guiada por las quimiocinas, era dependiente o independiente de la interacción con el endotelio, se realizaron ensayos de migración en ausencia de células endoteliales (*Figura 34 B*). Los resultados mostraban que tan sólo en la quimiotaxis mediada por CCL19, el tratamiento con EphA2-Fc inhibía significativamente el número de células migradas.

Todo ello sugería que la señal *reverse*, posiblemente a través de su ligando EFNA4, es capaz de modular de manera autónoma la quimiotaxis mediada por CCR7, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, pudiendo explicarse la inhibición de la TEM

mediada por CXCL12 y CXCL13 anteriormente observada por el tratamiento con EphA2-Fc como consecuencia de la interrupción en la interacción linfocito-endotelio a través de la mencionada vía EFNA4-EphA2.

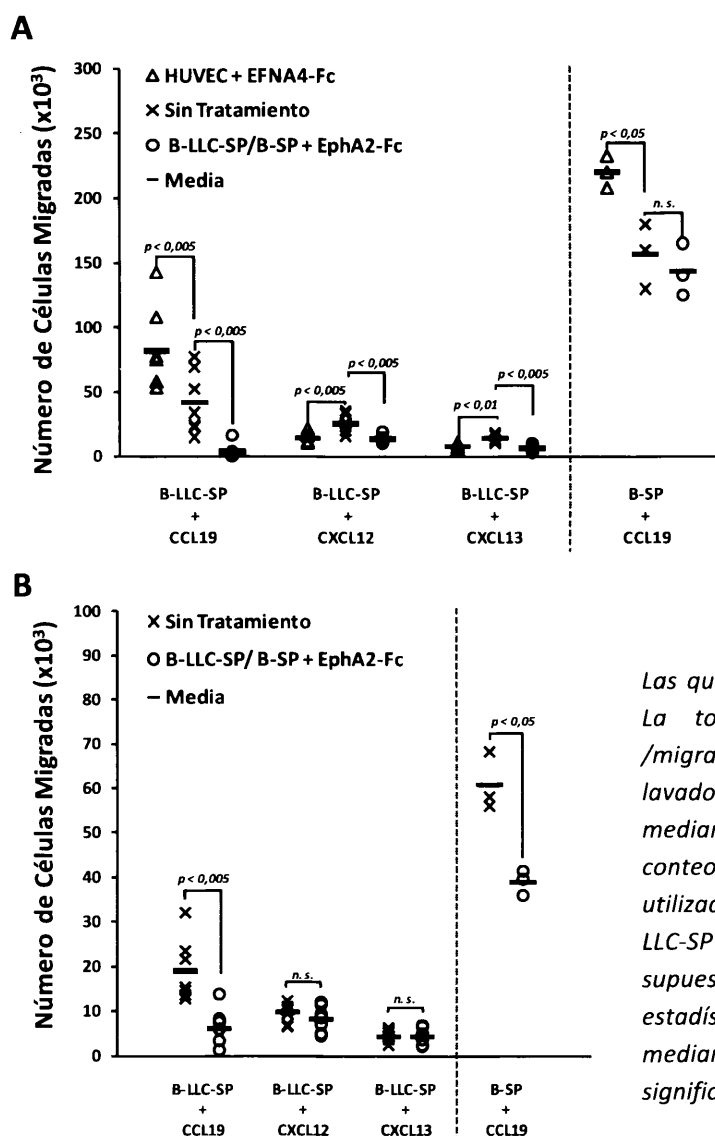


Figura 34. Transmigración y Migración se ven afectadas por el tratamiento con Eph/EFN recombinantes. Los ensayos **A)** Transmigración y **B)** Migración se realizaron siguiendo el mismo protocolo. En **A)** la monocapa de HUVEC se cultivo dos días antes sobre los filtros de migración y se pre-trataron durante la noche con TNF- α . En ambos tipos de ensayo, **A** y **B**, las quimioquinas recombinantes se añadieron en el compartimento inferior [CCL19 (500 ng/mL), CXCL12 (100 ng/mL) y CXCL13 (1000 ng/mL)], mientras en la parte superior se añadieron 5×10^5 células B pre-teñidas con CFSE, tratadas o no con EphA2-Fc.

Las quimiotaxis se mantuvieron durante 2 horas. La totalidad de las células transmigradas/migradas fueron recogidas mediante diversos lavados con PBS-EDTA, y su número estimado mediante citometría de flujo con microesferas de conteo. El número de muestras de cada tipo utilizados en estos ensayos fue: 3 x B-SP y 7 x B-LLC-SP (B-LLC-SP-1, -3, -4, -5, -8, -10 y -13). Cada supuesto se realizó por triplicado. La significación estadística de la diferencia entre medias se realizó mediante T-Student de muestras pareadas. n.s. no significativo.

2.8.- EphA2 parece regular la adhesión a endotelio a través de ICAM-1 y VCAM-1

Puesto que, en base a los resultados anteriores, la TEM parecía estar regulada, al menos en parte, por la interacción EFNA4-EphA2 y puesto que el tratamiento con EFNA4-Fc sobre HUVEC tenía un gran impacto en la TEM tanto de B sanas como B-LLC, decidimos profundizar más en los mecanismos y/o moléculas implicados en esta regulación sobre el endotelio a través de EphA2, receptor mayoritariamente expresado en el sistema vascular

analizado.

La aproximación a este estudio consistió en el tratamiento con EFNA4-Fc unida a fluorocromo durante 60 minutos de monocapas de HUVEC pre-estimuladas con TNF- α , fijadas a distintos tiempos y analizando la distribución apical-basal, mediante microscopía confocal, de la EFNA4-fluorescente y de EphA2 en relación a la monocapa. La observación a diferentes tiempos, mostró que la EFNA4-Fc, que al comienzo del tratamiento se puede encontrar como puntos fluorescentes en la superficie de la monocapa evaluada, tiende a migrar hacia el interior de las células endoteliales, concentrándose finalmente en la zona perinuclear, co-localizando abundantemente con EphA2 (*Figura 35*).

EphA2 parecía regular parte de la TEM sobre el endotelio que la expresa, pero esta regulación podría tener lugar a través de la asociación con moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1, cuya implicación en este proceso es ampliamente conocida (*Yong y Khwaja, 1990*). Anteriormente habíamos observado que EFNA4-Fc inducía la re-localización de EphA2 de HUVEC hacia los contactos con células B (*Figura 26 B*). De la misma manera, se evaluó si este tratamiento inducía también la re-localización de ICAM-1 y/o VCAM-1 con EphA2, infiriendo que la posible co-localización pudiera corresponderse con una posible cooperación (*Figura 36 A*).

Los porcentajes de co-localización encontrados, después de una hora de tratamiento, alcanzaron el 55% en el caso de EphA2-ICAM-1 y del 15% en el de EphA2-VCAM-1, indicando una posible implicación de este receptor con las moléculas de adhesión, especialmente con ICAM-1 (*Figura 36 A*). Estos resultados parecían apuntar que la posible regulación que EphA2 ejerce sobre la TEM podría deberse, en parte, a su asociación con ICAM-1, haciéndose necesaria la evaluación de la hipótesis complementaria, es decir, si el tratamiento con α -ICAM-1 era capaz de arrastrar la EphA2 (*Figura 36 B*) junto con VCAM-1 (*Figura 36 B*). Los análisis mostraron una co-localización de un 15% de ICAM-1 con VCAM-1, mientras que no se observó co-localización de ICAM-1 con EphA2 o mínima, indicando que mientras que ICAM-1 regula la TEM de manera independiente a EphA2, ésta la regularía a través de la asociación con moléculas de adhesión, como ICAM-1 y VCAM-1.

Figura 35. Complejos fluorescentes de EFNA4-Fc unidos a HUVEC en cultivo son translocados intracelularmente desde la superficie apical a la basal de la monocapa. Monocapas de HUVEC estimuladas previamente con TNF- α (10 ng/mL) se incubaron con complejos fluorescentes EFNA4-Fc + α -Hist-b + SAV-Alexa-Fluor[®]405. Los cultivos se fijaron a los 15, 30 ó 60 minutos para analizar, mediante microscopía confocal, la distribución de los complejos fluorescentes en las células. Series-Z se adquirieron desde apical a basal (resolución, 0,1 μ m). La distribución apical-basal de la fluorescencia (proyección pseudo-color, LCS, Leica), se cuantificó mediante segmentación de imágenes (MetaMorph versión 7.1), de acuerdo a la escala de color mostrada (rojo: apical, azul: basal). La imagen mostrada corresponde a un experimento representativo tras 60 minutos de cultivo.

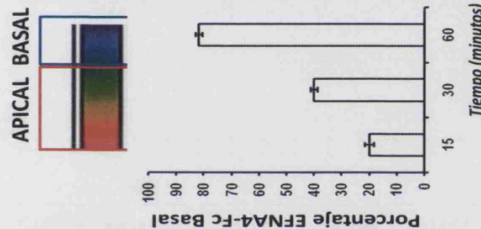
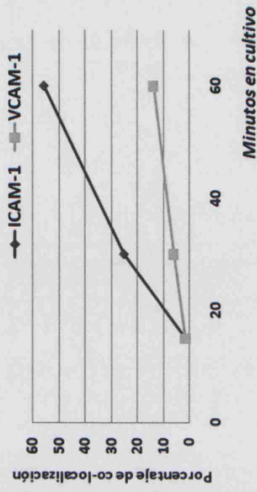


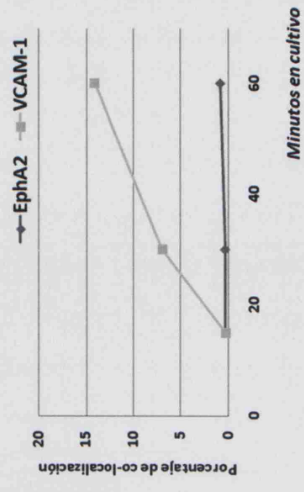
Figura 36. EphA2 se asocia a ICAM-1 en HUVEC tratadas con complejos fluorescentes de EFNA4-Fc. Monocapas de HUVEC pre-tratadas con TNF- α , se incubaron con (A) complejos fluorescentes EFNA4-Fc + α -Hist-b + SAV-Alexa-Fluor[®]405 o con (B) complejos ratón- α -ICAM-1 + α -ratón-Alexa-Fluor[®]488. Tanto en un caso los cultivos se fijaron a



A Tratamiento con EFNA4-Fc



B Tratamiento con α -ICAM-1



distintos tiempos (15, 30 ó 60 minutos) para determinar, mediante inmunofluorescencia, la co-localización de los complejos EFNA4-Fc-EphA2 (A) con ICAM-1 y VCAM-1 (B) con EphA2 y VCAM-1. Las tinciones fueron: (A) conejo- α -h-EphA2 + α -conejo-Alexa-Fluor[®]546; α -h-ICAM-1-Alexa-Fluor[®]488; ratón- α -h-VCAM-1 + α -ratón-Alexa-Fluor[®]633; (B) conejo- α -h-EphA2 + α -conejo-Alexa-Fluor[®]546; ratón- α -h-VCAM-1 + α -ratón-Alexa-Fluor[®]633. C) Los complejos fluorescentes EFNA4-Fc (A) o α -ICAM-1 (B), se analizaron en las imágenes de modo similar a la Figura 35, cuantificando la co-localización de EphA2 con ICAM-1 (A) o la de ICAM-1 con EphA2 ó VCAM-1 (B) (programas Leica LCS y MetaMorph). Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal (Leica TCS-SP2 AOBs, con objetivo de inmersión en aceite 63X, 1.40 NA).

3.- Estudio del posible papel de EFNA4 en la supervivencia de B-LLC mediada por endotelios

La supervivencia de las células B-LLC supone uno de los aspectos más controvertidos de la enfermedad. Las células procedentes de pacientes con LLC mueren progresivamente *in vitro* por apoptosis a los pocos días de cultivo, poniendo de manifiesto su dependencia de factores solubles y/o contactos con otros tipos celulares para contrarrestar su entrada en apoptosis. En este sentido, se han sugerido la implicación de diversos factores solubles como IL-6, IL-4 o VEGF (*Jablonska y cols., 2005; Hock y cols., 2006; Molica y cols., 2006*), el contacto con ciertas poblaciones celulares como linfocitos T, células del estroma en médula ósea (*Panayiotidis y cols., 1996; Lagneaux y cols., 1998; Pedersen y cols., 2002; Tsukada y cols., 2002; Plander y cols., 2009*), las propias células endoteliales de los vasos (*Long y cols., 1995; Buggins y cols., 2010*) y, en menor medida, la matriz extracelular o ciertos componentes de la misma, como fibronectina (*de la Fuente y cols., 1999*), si bien ésta última ha sido más relacionada con la resistencia a drogas de las B-LLC (*de la Fuente y cols., 2002*).

Basándonos en nuestros resultados previos que ponían de manifiesto el papel de EFNA4 en la adhesión de las células B-LLC a endotelio y a distintos componentes de la matriz extracelular, nos planteamos si estas interacciones podrían mediar también en su supervivencia como cuando las B-LLC se encuentran en el torrente circulatorio, donde se acumulan, como otros autores habían apuntado, y/o como cuando se encuentran en los ganglios infiltrados (*Ghia y Caligaris-Cappio, 2000; Hamblin, 2002; D'Arena y cols., 2003; Keating y cols., 2003; Ghia y Caligaris-Cappio, 2006; Ghia y cols., 2008*).

3.1.- Las muestras B-LLC-SP muestran diferentes capacidades de supervivencia *in vitro*

Previo a los ensayos sobre el papel de EFNA4 en la supervivencia de las células leucémicas en contacto con endotelio, quisimos analizar el perfil de caída espontánea de la misma *in vitro*, dado que en los datos en la literatura al respecto son muy heterogéneos (*Ghia y Caligaris-Cappio, 2000; Hamblin, 2002; D'Arena y cols., 2003; Keating y cols., 2003; Ghia y Caligaris-Cappio, 2006; Ghia y cols., 2008*). Para ello, utilizamos células B-LLC aisladas de sangre periférica de 12 pacientes cuyas características clínicas y moleculares eran heterogéneas y al tiempo representativas de la enfermedad (*Tabla 11*), evitando así una población sesgada, así como linfocitos B sanos aislados de 3 donantes. El análisis de células

vivas y apoptóticas en los cultivos se abordó por citometría de flujo mediante tinción combinada con Anexina-V-FITC y 7-AAD, considerando la población de células vivas como Anexina-V⁻/7-AAD⁻ y la de apoptóticas como Anexina-V⁺/7-AAD⁻.

Muestra	Edad	Sexo	Riesgo	Hb (g/dL)	Recuento leucocitario (x10 ⁹ /L)	CD38 (IMF)	ZAP-70 (IMF)	EFNA4 (IMF)
B-LLC-SP-1	71	F	1A	13,8	245,60	14,98	8,82	20,15
B-LLC-SP-2	88	F	4C	11,3	134,10	7,91	9,58	10,46
B-LLC-SP-3	95	M	ND	9,6	100,60	12,29	12,19	17,76
B-LLC-SP-4	87	F	4C	8,2	318,9	10,27	11,34	24,56
B-LLC-SP-5	84	F	ND	8,5	42,30	16,70	12,87	27,88
B-LLC-SP-6	63	M	ND	13,1	26,80	14,31	10,46	36,21
B-LLC-SP-7	71	M	ND	12,5	107,2	13,8	7,88	36,42
B-LLC-SP-8	81	M	2B	14,8	44,70	13,23	10,09	22,78
B-LLC-SP-9	90	F	1A	12,1	33,60	14,09	6,37	20,46
B-LLC-SP-10	77	M	ND	11,9	95,70	10,94	7,05	10,4
B-LLC-SP-11	73	M	ND	15,1	14,8	10,55	6,38	8,56
B-LLC-SP-12	82	F	ND	8,0	37,3	8,43	5,72	6,47

Tabla 11. Características clínicas de los pacientes LLC evaluados en el ensayo de viabilidad.

Los parámetros CD38, ZAP-70 y EFNA4 fueron analizados mediante citometría de flujo. Los datos clínicos, edad, sexo, riesgo, presencia de linfadenopatías, hemoglobina (Hb), recuento leucocitario y citogenética fueron facilitados por el hospital de procedencia de las muestras. M: Masculino, F: Femenino, ND: No Disponible, NR: No Realizado, IMF: Intensidad Media de Fluorescencia.

En estas condiciones, se observó que a 12 horas de cultivo, todas las muestras B-LLC ya presentaban una caída significativa en la supervivencia en relación al inicio de los mismos. Estas caídas de supervivencia resultaron, sin embargo, muy heterogéneas para las distintas B-LLC analizadas (Figura 37), encontrándose desde un 1,47% hasta un 67,78% de células vivas tras las 12 horas de cultivo, con una media de supervivencia del 29,83%, mientras que las B sanas mostraron un porcentaje de células vivas en el rango de 48,82% a 81,59%; y una media de supervivencia significativamente más alta, 65,09%. Atendiendo a las características clínicas y moleculares de las muestras examinadas (Tabla 11), no se observaron asociaciones con las supervivencias encontradas.

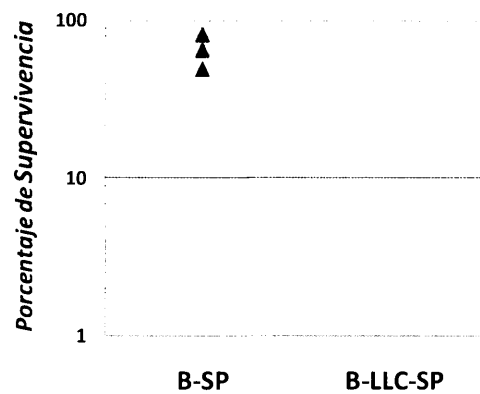


Figura 37. Supervivencia de células B, sanas y LLC, tras 12 horas de cultivo. $2,5 \times 10^5$ células fueron añadidas a cada pocillo. Tras 12 horas de cultivo, las células fueron recuperadas de los mismos con PBS-EDTA. Para determinar la proporción de células vivas de cada muestra cultivada, las suspensiones celulares se tiñeron con Anexina-V-PE y 7-AAD, considerando la población viva como la Anexina-V/7-AAD⁻. Los ensayos se realizaron con 3 muestras sanas B-SP y 12 muestras B-LLC, por triplicado.

3.2.- Estudio de la supervivencia de células B-LLC en co-cultivo con endotelio

El papel que las células endoteliales, aisladas o formando parte del sistema vascular, podrían jugar en la supervivencia de las B-LLC había sido sugerido en estudios previos, bien a través de la utilización, principalmente, de líneas celulares endoteliales (Long y cols., 1995) (Moreno y cols., 2001) bien a través de evidencias indirectas (Zucchetto y cols., 2009), aunque el papel del endotelio en LLC no quedaba del todo clarificado, existiendo controversias en relación a la importancia del contacto directo entre ambos tipos celulares (Moreno y cols., 2001). A pesar de estas controversias, la interacción VLA-4/VCAM-1 en el contacto B-LLC-endotelio, se postula hoy como el principal mecanismo de rescate de apoptosis de B-LLC (Buggins y cols., 2010), aunque este papel no ha sido concluyentemente demostrado con cultivos primarios de células endoteliales. Además, como los propios autores apuntaban, el rescate de apoptosis de las B-LLC era más evidente tras varios días de co-cultivo sugiriendo, por tanto, que el efecto de la mayor supervivencia podría deberse a la acumulación de determinados factores solubles, como ya otros autores habían sugerido previamente, tras la utilización de otra línea celular (Moreno y cols., 2001).

En base a nuestro estudio preliminar, donde determinábamos un descenso significativo de la supervivencia de las B-LLC tras 12 horas cultivadas solas, decidimos analizar si el co-cultivo con células endoteliales primarias, HUVEC, podría ser suficiente para inducir la supervivencia de B-LLC en ese mismo intervalo de tiempo, a la par que evaluábamos el papel de la interacción EphA2-EFNA4 en este sistema.

Para ello, células B-LLC-SP y B-SP se co-cultivaron con monocapas de HUVEC pre-estimuladas, o no, con la citocina inflamatoria TNF- α (Figura 38), considerando que en las pre-estimuladas se produce un fuerte incremento en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, lo que constituye un modelo clásico de adhesión a endotelio (Cinamon y cols., 2004), junto con un incremento de EphA2 como nosotros habíamos demostrado y en consonancia con otros autores (Pandey y cols., 1995).

En estas condiciones de co-cultivo, y contrariamente a lo esperado en base a los resultados anteriormente publicados, no sólo no se observó un incremento significativo de la supervivencia en ninguna de las poblaciones B analizadas, LLC o sanas, sino que se observó una caída en la proporción de células vivas, acompañada de un incremento significativo en la de células apoptóticas, en condiciones pro-inflamatorias pero no en basales (Figura 38).

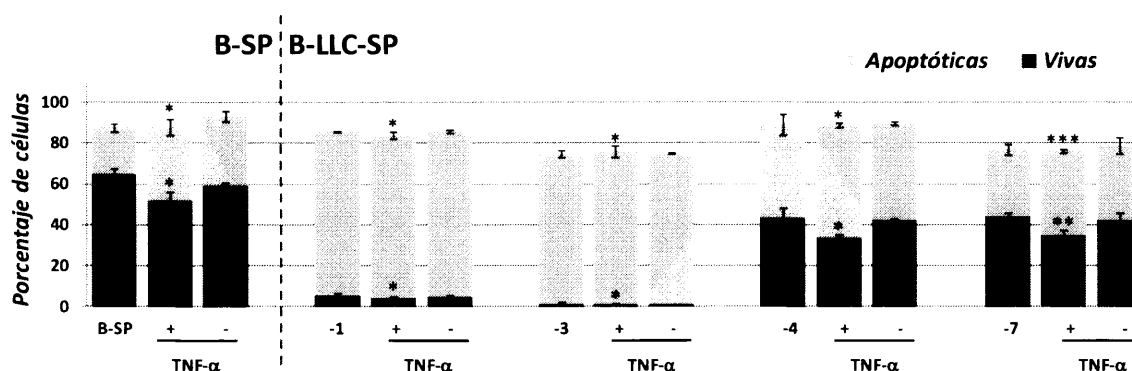


Figura 38. Células endoteliales HUVEC estimuladas con TNF- α inducen apoptosis de células B, sanas (B-SP) o B-LLC-SP. Monocapas de células HUVEC fueron estimuladas, o no, con TNF- α (10 ng/mL) durante toda la noche, retirándose el estímulo al menos 2 horas antes de añadir $2,5 \times 10^5$ linfocitos B, sanos o LLC, al cultivo. Los co-cultivos se mantuvieron 12 horas, tras lo cual la totalidad de las células se recuperaba mediante diversos lavados con PBS-EDTA. La supervivencia se determinó mediante citometría de flujo con tinciones para CD19-FITC, Anexina-V-PE y 7-AAD, discriminando la población viva y apoptótica en la población acotada CD19⁺. La significación estadística de la diferencia de medias se realizó mediante el estadístico T-Student para muestras pareadas, suponiendo dos colas de distribución (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; y *** $p < 0,005$). En la gráfica se muestran los resultados individuales obtenidos para las muestras B-LLC-SP-1, B-LLC-SP-3, B-LLC-SP-4 y B-LLC-SP-7 y el promedio de 3 muestras en el caso de B sanos. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Con el fin de determinar si las condiciones de cultivo y/o las muestras analizadas podrían ser las responsables de este resultado aparentemente contradictorio con las evidencias existentes, repetimos los ensayos con la línea endotelial EA.hy926, la cual había

sido previamente utilizada en este tipo de ensayos (Long y cols., 1995). De acuerdo con lo reportado en estos estudios, el co-cultivo de las B-LLC con la línea endotelial, tanto en condiciones pro-inflamatorias como basales, resultaba en un incremento de la supervivencia de las células B (Figura 39 A).

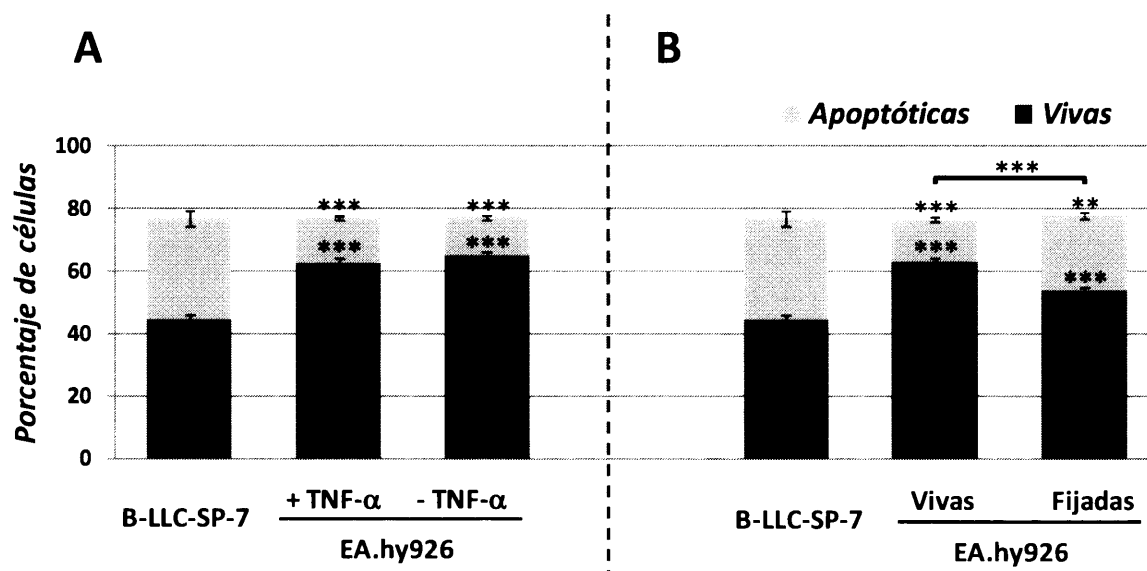


Figura 39. La línea celular endotelial EA.hy926 induce supervivencia de B-LLC. A) Células EA.hy926 cultivadas en confluencia fueron estimuladas o no, con TNF- α (10 ng/mL), siendo retirada al menos 2 horas antes del co-cultivo con $2,5 \times 10^5$ linfocitos B durante 12 horas. La totalidad de las células se recuperó en PBS-EDTA. **B)** Se analizó si el contacto con la línea endotelial, vivas y fijadas, provocaba variación en términos de supervivencia en B-LLC-SP. Tras alcanzar confluencia, la línea endotelial fue estimulada con TNF- α (10 ng/mL). Tras ser retirada, la mitad de estos pocillos se fijó con paraformaldehído al 4% (Cellfix) y tras diversos lavados con PBS y medio de cultivo se añadieron $2,5 \times 10^5$ linfocitos B-LLC, que se cultivaron o co-cultivaron in vitro durante toda la noche. Mediante PBS-EDTA se recogió la totalidad de la muestra. En ambos casos, **A)** y **B)**, se realizaron marcajes con CD19-FITC, Anexina-V-PE y 7-AAD, para su posterior análisis mediante citometría de flujo. Todos los supuestos se realizaron por triplicado. La comparación de medias entre grupos se realizó mediante el estadístico T-Student, suponiendo dos colas de distribución (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; y *** $p < 0,005$). La barra horizontal del apartado **B)** hace referencia a la diferencia significativa entre el co-cultivo con EA.hy926 vivas y fijadas, siendo aplicable tanto al porcentaje de células vivas como al de apoptóticas. Estos ensayos se realizaron con las muestras B-LLC-SP-7, B-LLC-SP-8 y B-LLC-SP-9, mostrándose los datos correspondientes a la primera, como ejemplo representativo.

Con el fin de determinar si el efecto diferencial entre ambos tipos celulares podía relacionarse con los contactos célula B-endotelio y/o con la liberación de factores solubles, se realizaron co-cultivos con las células endoteliales, primarias o línea, fijadas en paraformaldehído al 4% (Figura 39 B y Figura 40), excluyéndose así la posible liberación de factores solubles por parte de las endoteliales. En ambos casos, HUVEC y EA.hy926, los co-

cultivos con endoteliales fijadas registraron un descenso significativo en la supervivencia de las B-LLC en relación al co-cultivo con endotelios vivos (Figura 39 B y Figura 40).

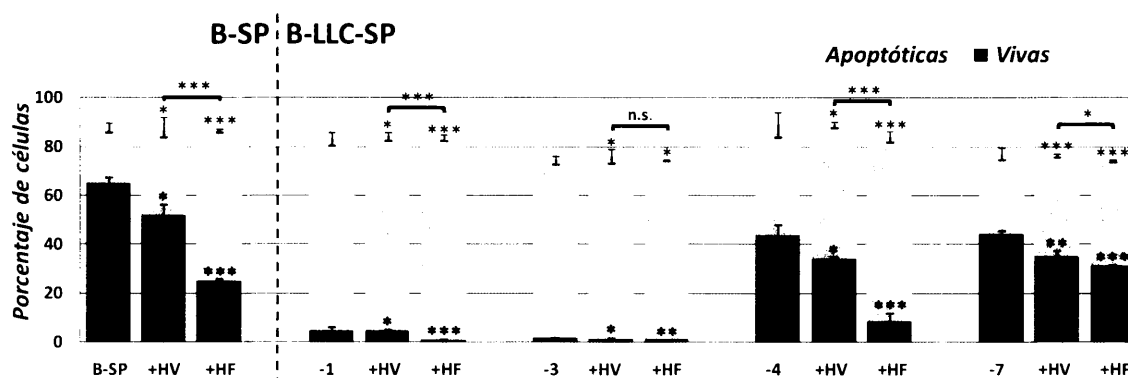


Figura 40. La supervivencia de células B, sanas o LLC, es mayor en co-cultivo con HUVEC vivas. Monocapas de HUVEC se estimularon con TNF- α (10 ng/mL), la cual fue retirada al menos 2 horas antes del ensayo. La mitad de los pocillos de HUVEC se fijó con paraformaldehído al 4% (Cellfix) y se lavaron con PBS y medio de cultivo para eliminar cualquier traza del mismo. $2,5 \times 10^5$ linfocitos B se cultivaron o co-cultivaron in vitro durante 12 horas con HUVEC vivas (HV) o fijadas (HF). La totalidad de las células se recuperó con PBS-EDTA. El análisis de supervivencia se determinó mediante citometría de flujo tiñendo las células con CD19-FITC, Anexina-V-PE y 7-AAD discriminándose la población viva y apoptótica. Todos los supuestos se realizaron por triplicado. La significación estadística de la diferencia entre medias se realizó mediante el estadístico T-Student, para muestras pareadas, suponiendo dos colas de distribución (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; y *** $p < 0,005$). La barra horizontal hace referencia a la diferencia significativa entre el co-cultivo con HUVEC vivas y fijadas, siendo aplicable tanto al porcentaje de células vivas como al de apoptóticas. En el gráfico se muestran los resultados de cada una de las muestras LLC analizadas (B-LLC-SP-1, B-LLC-SP-3, B-LLC-SP-4 y B-LLC-SP-7) y el promedio obtenido para 3 muestras procedentes de donantes sanos, B-SP.

Estos resultados parecían evidenciar que el mero contacto de las células B, LLC o sanas, con células endoteliales modificaba, al menos a corto plazo, su supervivencia, disminuyéndola en el caso de células endoteliales primarias (HUVEC) y aumentándola en el caso de la línea EA.hy926, lo que sugiere que presumiblemente las líneas endoteliales comúnmente utilizadas no representen fielmente la condición de las células primarias de las que derivan. Además, en ambos casos, la eliminación de la actividad de las células endoteliales reducía los cambios en la supervivencia/muerte de las células B, sugiriendo cierto papel de factores solubles en el proceso.

Estos resultados evidenciaban que la caída de la supervivencia en los co-cultivos de células B con la línea primaria HUVEC seguía aparentemente un patrón similar en las células

leucémicas y en los linfocitos B sanos (Figuras 38 y 40). Así, el contacto con el endotelio provocaba una reducción en la supervivencia de las células leucémicas B-LLC del 0,84 con el endotelio vivo y del 0,42 con el fijado, muy similares al observado en las células B sanas, de 0,80 y 0,38, respectivamente. Sin embargo, al analizar el comportamiento de las muestras de manera individualizada, observamos que si bien el co-cultivo con el endotelio vivo provocaba efectos similares en la supervivencia de las B-LLC entre todas ellas respecto a las células B sanas, el co-cultivo con el endotelio fijado parece producir dos efectos radicalmente distintos. En el caso de las muestras 3 y 7 la caída de supervivencia era menor que el de las B sanas y en el de las muestras 1 y 4 mayor (Figura 41). Estos dos grupos, sin embargo, no correlacionaron con las capacidades de supervivencia anteriormente observadas, como *a priori* se podría pensar.

Supervivencia en presencia/ausencia de endotelio

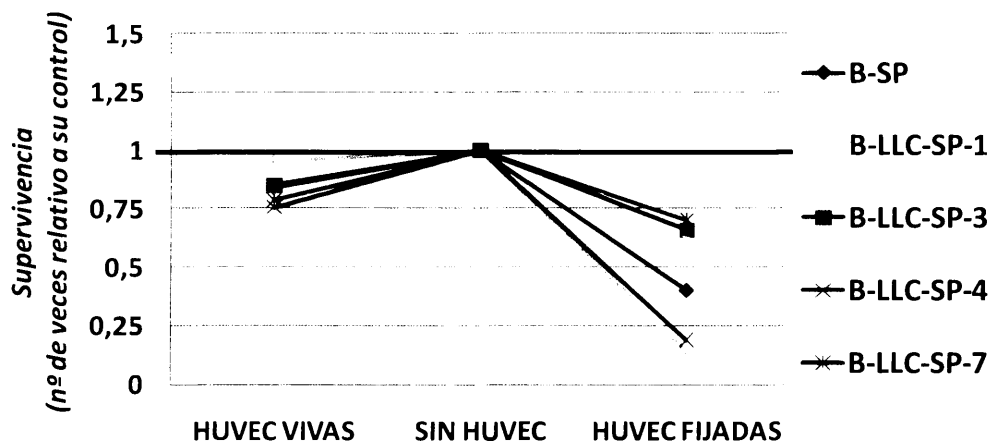


Figura 41 Supervivencia de células B, sanas y leucémicas, co-cultivadas con células endoteliales HUVEC, vivas o fijadas, relativizada al cultivo solas. Los resultados de los experimentos mostrados en la Figura 40 fueron normalizados a la supervivencia de cada muestra en ausencia de endotelio.

Para intentar explicar más estos resultados y dada la importancia de los contactos célula B-endotelio en la supervivencia de las primeras, decidimos evaluar mediante citometría de flujo la expresión de las integrinas LFA-1 y VLA-4 en las B-LLC (Tabla 12), puesto que las interacciones ICAM-1/LFA-1 y VCAM-1/VLA-4 suponen dos de las vías más importante en la comunicación linfocito-endotelio y por su posible importancia en la enfermedad que otros autores han señalado (Jewell y Yong, 1997). Al comparar los niveles de expresión obtenidos para estas integrinas en B-LLC y en B-SP (Tabla 12), observamos que las muestras B-LLC

tienen muy reducida la expresión de CD11a y de CD49d, es decir, de las subunidades α L y α 4, respectivamente. De la misma manera analizamos comparativamente la expresión de la subunidades β , β 2 y β 1, respectivamente. La subunidad β 2 de la integrina LFA-1, ó CD18, parecía expresarse diferencialmente en las muestras B-LLC, de manera que mientras que en dos de ellas los niveles encontrados son similares a los encontrados para las muestras sanas, en las otras muestras B-LLC los niveles de expresión estaban reducidos. Por último, la expresión de la subunidad β 1 de la integrina VLA-4, ó CD29, parece estar aumentada, en relación a la encontrada en linfocitos B sanos, en tres de las cuatro muestras evaluadas.

Muestra	CD11a (IMF)	CD18 (IMF)	CD49d (IMF)	CD29 (IMF)
B-SP-1	390,47	65,53	299,93	24,03
B-SP-2	557,31	56,77	245,31	23,08
B-LLC-SP-1	13,32	67,84	8,97	55,24
B-LLC-SP-3	17,46	30,44	55,04	87,32
B-LLC-SP-4	13,58	45,74	11,74	40,27
B-LLC-SP-7	16,08	11,01	13,06	18,43

Tabla 12. Expresión de integrinas en B-LLC. Se determinó la expresión de las integrinas CD11a, CD18, CD29 y CD49d mediante citometría de flujo en las muestras B-LLC-SP con las que se realizó este estudio y en 2 muestras procedentes de donantes sanos. IMF (Intensidad Media de Fluorescencia).

Al relacionar la intensidad de la muerte en células B-LLC provocada por el endotelio fijado, con la expresión de las distintas integrinas, encontrábamos una alta correlación inversamente proporcional ($r=-0,91$) entre la expresión de CD18 y el efecto pro-apoptótico producido por el endotelio fijado; de manera que, las muestras B-LLC que tienen unos niveles de expresión similares o solo ligeramente menores que los de las células B-SP, sufrían una fuerte reducción en su supervivencia; mientras que las muestras B-LLC con menor expresión de CD18, en comparación con la encontrada en B-SP, sufrieron una reducción de su supervivencia mucho menor. Estos resultados parecían poner de manifiesto de nuevo, que la interacción de las células B, sanas y leucémicas, con el endotelio provoca un aumento en la apoptosis de las primeras de manera proporcional a la intensidad de su interacción.

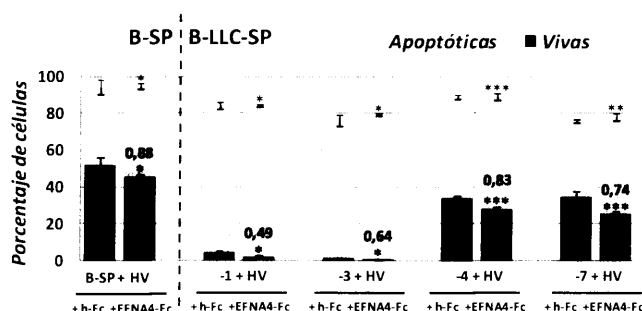
3.3.- Papel de la interacción EphA2-EFNA4 en la apoptosis de B-LLC co-cultivadas con HUVEC

A continuación, analizamos si la interacción EphA2-EFNA4 podría estar también implicada en el efecto pro-apoptótico mediado por HUVEC, como vimos que ocurría en el

caso de la TEM. Para contrastar esta hipótesis, introdujimos en los co-cultivos las proteínas recombinantes EphA2-Fc o EFNA4-Fc, de forma similar a los ensayos de TEM anteriormente descritos, es decir, pre-incubando las células B, LLC y sanas, o las HUVEC, respectivamente, por separado y antes del co-cultivo correspondiente y, de esta manera, comprobar si la ausencia de esta interacción explicaba, en todo o parcialmente el fenómeno observado (Figuras 42 y 43).

El tratamiento de la monocapa de HUVEC vivas con EFNA4-Fc, previo al co-cultivo, resultaba en un incremento significativo en la proporción de células B apoptóticas, tanto sanas como B-LLC (Figura 42 A), en comparación con los cultivos control, tratados con h-Fc, sugiriendo que la interacción EphA2-EFNA4 podría jugar un papel determinante en este proceso, al igual que lo observado en los ensayos de TEM.

A Co-cultivo Células B + HV



B Co-cultivo Células B + HF

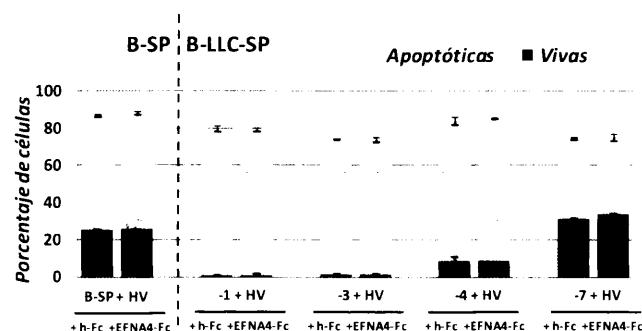


Figura 42. El tratamiento con EFNA4-Fc al endotelio provoca una mayor apoptosis cuando las células B se co-cultivan con HUVEC fijadas. Monocapas de HUVEC estimuladas con TNF- α se incubaron con EFNA4-Fc o h-Fc. Previo a la adición de las células B al co-cultivo, la mitad de los cultivos de HUVEC se mantuvieron vivos (HV) (A) o se fijaron con PF 4% (HF) (B). El co-cultivo se mantuvo 12 horas y se evaluó la supervivencia mediante citometría de flujo como en apartados anteriores. Todos los supuestos se realizaron por triplicado. La significación estadística de la diferencia entre medias se determinó mediante el test estadístico T-student para muestras pareadas (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; y 0,005). *** $p < 0,005$). Los resultados corresponden a cada una de las muestras B-LLC (B-LLC-SP-1, B-LLC-SP-3, B-LLC-SP-4 y B-LLC-SP-7) o el promedio de 3 muestras en el caso de B sanas. El efecto del tratamiento relativo al control h-Fc, se indica sobre cada uno de ellos.

Basándonos en nuestros propios resultados, donde demostrábamos que el tratamiento de EFNA4-Fc sobre HUVEC incrementaba la adhesión y trans migración de las células B, decidimos realizar estos experimentos con la monocapa de HUVEC fijada (*Figura 42 B*), tras el tratamiento con EFNA4-Fc, evitando así el posible efecto de la trans migración en el efecto observado, a parte naturalmente de bloquear, como antes comentábamos, la producción de factores solubles. En estas condiciones de cultivo, la baja supervivencia de las células B observada previamente con HUVEC fijadas, no mostraba diferencias significativas entre la condición control y el tratamiento con la EFNA4-Fc (*Figura 42 B*). Consiguientemente, la señalización *forward* hacia el endotelio, parecía jugar un papel importante en el fenómeno pro-apoptótico, aunque no parecía ser la única responsable del fenómeno. Además, estos resultados indicaban que la señalización *reverse*, presumiblemente a través de EFNA4 en las células B, no era, o al menos no por sí sola, la causante de la muerte observada tras su contacto con el endotelio.

Para comprobar este último extremo, realizamos co-cultivos en los que las células B fueron pre-tratadas con EphA2-Fc (*Figura 43*). En estas condiciones, en las que era posible descartar la señalización *forward* hacia el endotelio, pero no la *reverse* hacia las células B-LLC, pudimos observar que con HUVEC vivas se mantenía el efecto pro-apoptótico de los endotelios (*Figura 43 A*), sin que el tratamiento lo aumentara o disminuyera significativamente. Sin embargo, cuando se utilizaban HUVEC fijadas (*Figura 43 B*) se observó, en algunas de las muestras B-LLC (-3, -4 y -7), un incremento significativo en las células vivas, junto con una disminución proporcional de las apoptóticas, en relación con la ausencia del tratamiento. El análisis de los efectos provocados por el tratamiento con EphA2-Fc sobre las muestras B-LLC, puso de manifiesto que la intensidad de los efectos observados era mayor en las muestras que presentaban una mayor expresión de EFNA4 (*Tabla 11*) y en las muestras que presentaban una mayor supervivencia espontánea, de entre las analizadas en este apartado (*Figura 37*).

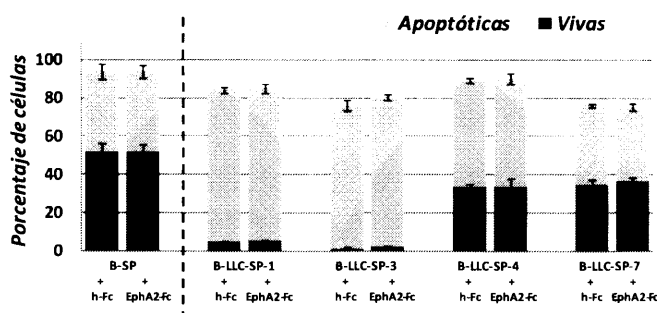
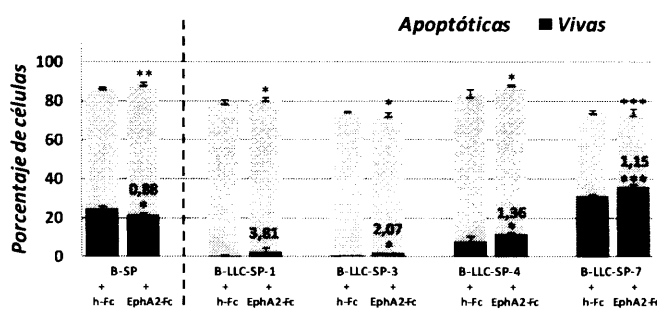
A Co-Cultivo Células B + HV**B Co-Cultivo Células B + HF**

Figura 43. El tratamiento con EphA2Fc a células B provoca una mayor supervivencia en B-LLC co-cultivan con HUVEC fijadas. Monocapas de HUVEC estimuladas con $\text{TNF-}\alpha$ se incubaron con EFNA4-Fc o h-Fc. Previo a la adición de las células B al co-cultivo, la mitad de los cultivos de HUVEC se mantuvieron vivos (HV) (A) o se fijaron con PF 4% (HF) (B). El co-cultivo se mantuvo 12 horas y se evaluó la supervivencia mediante citometría de flujo como en apartados anteriores. La significación estadística de la diferencia entre medias se determinó mediante el test estadístico T-student para muestras pareadas (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; y *** $p < 0,005$). Todos los supuestos se realizaron por triplicado. Los resultados corresponden a cada una de las muestras B-LLC (B-LLC-SP-1, B-LLC-SP-3, B-LLC-SP-4 y B-LLC-SP-7) o el promedio de 3 muestras en el caso de B sanas. El efecto del tratamiento relativo al control h-Fc, se indica sobre cada uno de ellos.

Una conclusión que podía extraerse de estos experimentos era, por tanto, que la interacción EphA2-EFNA4, si bien no explicaba por sí misma todo el fenómeno apoptótico de los endotelios sobre las células B, parecía mediar también en él; presumiblemente, como indicaban nuestros resultados previos de TEM, a través de mediar en la adhesión linfocito-endotelio y, por tanto, a través de otras moléculas implicadas en este proceso.

3.4.- Papel de ICAM-1, VCAM-1 y EphA2 en la apoptosis de B-LLC mediada por contactos con endotelio

En la misma línea de estos anteriores resultados y dado el papel jugado por las moléculas de adhesión (CAM) ICAM-1 y VCAM-1 en la TEM de las células B-LLC, analizamos su posible implicación en el fenómeno pro-apoptótico observado. De hecho, los efectos pro-apoptosis más significativos se producían tras el tratamiento con $\text{TNF-}\alpha$ (Figura 38), cuando la expresión de estas moléculas aumentaba en HUVEC. Basándonos en estas evidencias junto con la aparente relación observada entre la expresión de las integrinas en las B-LLC y la

capacidad de inducir muerte por parte del endotelio, quisimos determinar si la adición de formas recombinantes de estas moléculas (rh-ICAM-1 y rh-VCAM-1) afectaban a la supervivencia de las B-LLC en los co-cultivos con HUVEC vivas (*Figura 44*), asumiendo que dichas formas recombinantes debían bloquear las interacciones célula B-endotelio a través de ICAM-1 y VCAM-1.

Tratamiento con rh-CAM en co-cultivos con HV

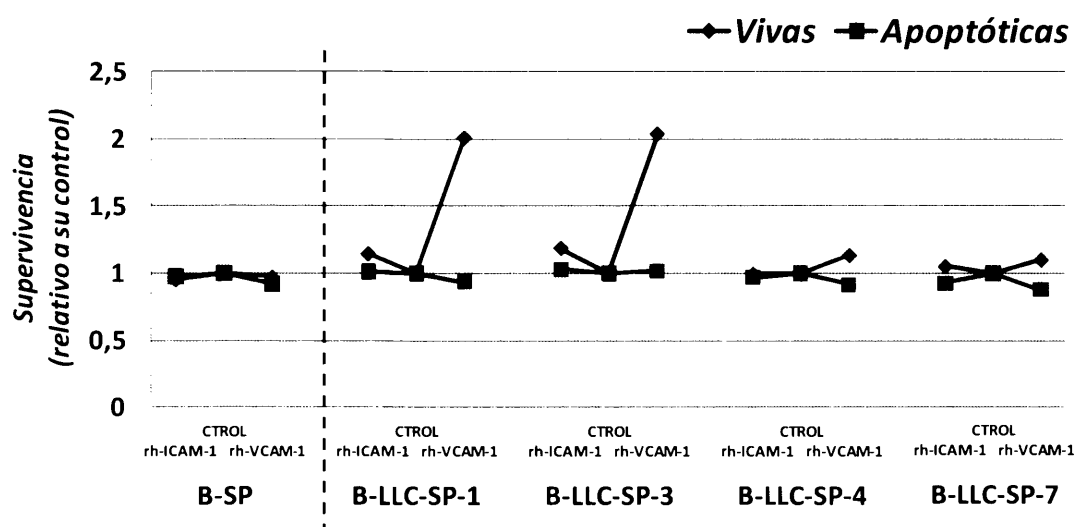


Figura 44. La adición de formas solubles recombinantes de ICAM-1 ó VCAM-1 a co-cultivos de células B-LLC con HUVEC vivas recupera parcialmente su supervivencia. Células B, sanas o leucémicas, se co-cultivaron durante 12 horas con monocapas de HUVEC vivas pre-estimuladas con TNF- α , en presencia o ausencia (CTROL) de 0,1 μ g/pocillo de rh-ICAM-1 o rh-VCAM-1. La supervivencia se evaluó por citometría de flujo tras tinción con CD19-FITC, Anexina-V-PE y 7-AAD. La proporción de células CD19⁺ vivas recuperadas en los tratamientos se relativizó a su control. Los datos corresponden a las muestras B-LLC individualizadas (B-LLC-SP-1, -3, -4 y -7) y el promedio obtenido para las 3 muestras B sanas, B-SP. CTROL: co-cultivo en ausencia de rh-CAM. Todos los supuestos se realizaron por triplicado.

Como se muestra en la *Figura 44*, la presencia de una u otra proteína, producía en los co-cultivos un incremento significativo en la supervivencia de las B-LLC en relación a co-cultivos sin tratamiento, siendo más notoria la producida por la adición de rh-VCAM-1. Este efecto, mediado a través de las interacciones de ICAM-1 ó VCAM-1, parecía ser característico de las B-LLC, puesto que no fue observado en las B sanas (*Figura 44*).

Puesto que los ensayos anteriores habían sido realizados con HUVEC vivas y puesto que ICAM-1 y VCAM-1 suelen asociarse física y funcionalmente durante la TEM de linfocitos, cabía la posibilidad de que algo similar, a modo de intercomunicación entre ellas, tuviera lugar de cara al proceso de apoptosis estudiado por lo que procedimos a analizar nuevamente el efecto de la adición de estas moléculas en los co-cultivos pero esta vez sobre HUVEC fijadas (Figura 45) en las que, lógicamente el posible papel de ICAM-1 o VCAM-1 sobre la supervivencia de las B-LLC, sólo podía ser atribuible a la señalización vía integrinas expresadas sobre las B-LLC. En estas condiciones, el efecto de la adición de formas solubles de rh-ICAM-1 o rh-VCAM-1, sorprendentemente, desaparecía prácticamente en la totalidad de las muestras LLC analizadas, llegando incluso a traducirse en un descenso aún mayor de la supervivencia de las células leucémicas, aunque no significativo (Figura 45), a excepción de una muestra, la B-LLC-SP-1 en la que sí se observaba una supervivencia significativamente mayor, de modo similar a la condición con HUVEC vivas.

Tratamiento con rh-CAM en co-cultivos con HF

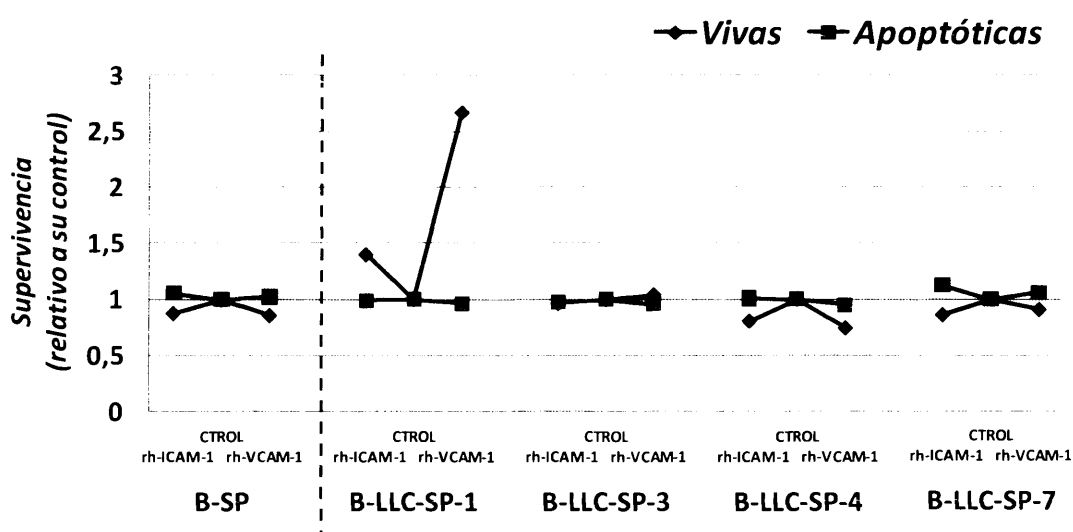


Figura 45. La adición de formas solubles recombinantes de ICAM-1 ó VCAM-1 a co-cultivos de células B-LLC con HUVEC fijadas revierte el efecto observado en su supervivencia con HUVEC vivas. Células B, sanas o leucémicas, se co-cultivaron durante 12 horas con monocapas de HUVEC pre-estimuladas con TNF- α y fijadas, en presencia o ausencia (CTROL) de 0,1 μ g/pocillo de rh-ICAM-1 o rh-VCAM-1. La supervivencia se evaluó por citometría de flujo tras tinción con CD19-FITC, Anexina-V-PE y 7-AAD. La proporción de células CD19⁺ vivas recuperadas en los tratamientos se relativizó a su control. Los datos corresponden a las muestras B-LLC individualizadas (B-LLC-SP-1, -3, -4 y -7) y el promedio obtenido para las 3 muestras B sanas, B-SP. CTROL: co-cultivo en ausencia de rh-CAM. Todos los supuestos se realizaron por triplicado.

En relación con los efectos observados, el aparente papel de ICAM-1 y VCAM-1, decidimos analizar si los niveles de expresión de las integrinas descritos anteriormente sobre las células frescas (*Tabla 12*) podían estar relacionados con los efectos observados tras la adición de las proteínas de adhesión recombinantes, rh-ICAM-1 o rh-VCAM-1, sobre la apoptosis B-LLC. En este sentido, se observó asociación positiva entre los niveles de expresión de CD29 (no así con CD11a, CD18 ó CD49d) y el efecto revertido de apoptosis en los cultivos tratados con rh-VCAM-1 ($r=0,855$), sugiriendo que la señal a través de VCAM-1 podría ser responsable, al menos parcialmente, del efecto pro-apoptótico de HUVEC sobre las B-LLC.

¿Cómo relacionar este papel de ICAM-1/LFA-1 y VCAM-1/VLA-4 en la supervivencia de las células B-LLC tras interaccionar con el endotelio con el jugado por EFNA4-EphA2, descrito anteriormente, dado que dichas moléculas de adhesión, especialmente ICAM-1, se asocian con EphA2 y el tratamiento con EphA2-Fc sólo afectaba la supervivencia de las células leucémicas cuando HUVEC estaban fijadas y, principalmente, a aquellas muestras con una fuerte expresión de EFNA4? Una posibilidad podía ser que EphA2/EFNA4 regulara la adhesión entre ambos tipos celulares, como habíamos observado en la TEM, modulando las interacciones ICAM-1/VCAM-1 con sus ligandos, LFA-1/ VLA-4, respectivamente, en las B-LLC. Para comprobar esta hipótesis, se realizaron co-cultivos en tratamientos mixtos, células B tratadas con EphA2-Fc en presencia de rh-ICAM-1 ó rh-VCAM-1 (*Figura 46*). De esta manera, la interacción EphA2-EFNA4 quedaba interrumpida, lo que impedía la señalización *forward* vía EphA2 al endotelio y, por tanto, su posible efecto sobre ICAM-1 ó VCAM-1, mientras que, al menos en B-LLC, la señalización *reverse* vía EFNA4 debía traducirse en una menor adhesión a ICAM-1 y VCAM-1, como habíamos observado en nuestros experimentos de adhesión previos (*Figura 33*).

En la condición de células HUVEC vivas (*Figura 46*), el tratamiento combinado de rh-ICAM-1 y EphA2-Fc incrementaba aún más la supervivencia de las B-LLC que el tratamiento con rh-ICAM-1 solo previamente observado (*Figura 44*). Por el contrario, el tratamiento combinado de rh-VCAM-1 y EphA2-Fc revertía el efecto del tratamiento con VCAM-1 solo (*Figura 44*), resultando en un descenso de la supervivencia en relación a este tratamiento.

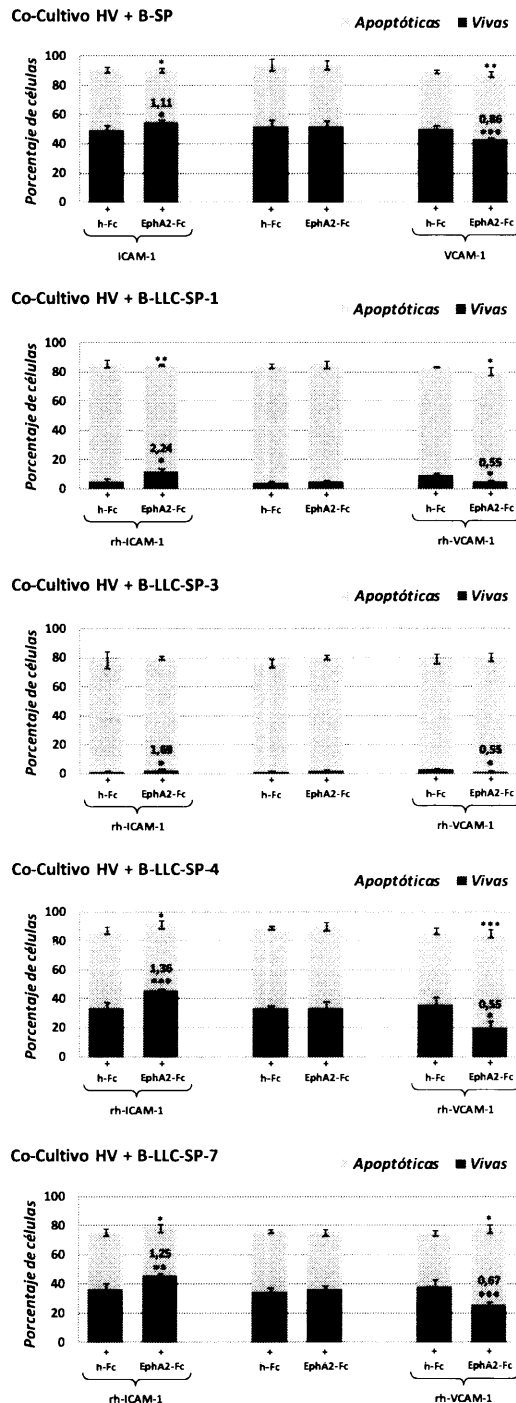


Figura 46. EphA2-Fc sobre co-cultivos de células B con HV en presencia/ausencia de ICAM-1 o VCAM-1. Monocapas de HUVEC estimuladas con TNF- α (10 ng/mL, durante toda una noche) se co-cultivaron 12 horas con $2,5 \times 10^5$ células B pre-incubadas o no (h-Fc) con EphA2-Fc en presencia o no de rh-ICAM-1 ó rh-VCAM-1. La supervivencia se evaluó mediante citometría de flujo como en apartados anteriores. La significación estadística de la diferencia entre medias se determinó mediante el test estadístico T-student para muestras pareadas (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$). Todos los supuestos se realizaron por triplicado. Los resultados corresponden a cada una de las muestras B-LLC (B-LLC-SP-1, B-LLC-SP-3, B-LLC-SP-4 y B-LLC-SP-7) o el promedio de 3 muestras en el caso de B sanas. El efecto del tratamiento relativo al control h-Fc, se indica sobre cada uno de ellos.

Por tanto, estos resultados ponían de manifiesto un papel activo de la señalización *reverse*, presumiblemente a través de EFNA4, en el efecto pro-apoptótico del contacto B-LLC/endotelio, mediado por las interacciones a través de ICAM-1 y VCAM-1, presumiblemente a través de sus correspondientes ligandos LFA-1 y VLA-4, respectivamente, expresados por las B-LLC. Además, ponían de manifiesto que debía existir un balance de señales entre ICAM-1 y VCAM-1, en relación con supervivencia, manifestándose cuando

existe una señalización *reverse*, presumiblemente a través de EFNA4 por la propia agregación de esta molécula a través de EphA2-Fc y/o en ausencia de señalización *forward* en el endotelio.

Consiguientemente, estos resultados sugerían, como planteábamos anteriormente, que las señales de supervivencia promovidas por ICAM-1 y VCAM-1 se cruzan en la célula endotelial, como en su conocida colaboración en TEM, y/o en la célula B que las recibe a través de integrinas, compensándose mutuamente y modulando las señales pro-apoptóticas en las B-LLC, actuando la interacción EphA2-EFNA4 como moduladora de estas señales.

Discusión

La presente Tesis doctoral describe por primera vez la expresión (*Alonso y cols., 2009*) y función (*Trinidad y cols., 2009*) de Eph/EFN en relación con la clínica de un cáncer linfoide, la leucemia linfática crónica (LLC), describiéndose en relación con tal expresión, un nuevo mecanismo molecular en la migración transendotelial o diapédesis de linfocitos B mediado por estas moléculas (*Trinidad y cols., 2009*). Queremos destacar que, además, nuestro trabajo introduce una nueva visión de ciertos aspectos de la biología de esta enfermedad. Concretamente, demostramos por primera vez que las células B-LLC presentan una menor capacidad de migración transendotelial (TEM) que las células B sanas (*Trinidad y cols., 2009*) y que las células B-LLC evaden la posible capacidad de los endotelios para inducir apoptosis bajo ciertas condiciones. Por otra parte, se describe un nuevo mecanismo molecular implicado en la TEM de linfocitos mediado por las interacciones EphA2-EFNA4 (*Trinidad y cols., 2009; Trinidad y cols., 2010*), que consideramos abre un nuevo campo tanto en lo que respecta al tráfico linfocitario como en las funciones de esta familia de moléculas. Finalmente, pensamos, y esperamos que este conjunto de datos resulte útil en la clínica de esta enfermedad, tanto por la potencialidad de Eph/EFN, como nuevos marcadores de pronóstico (*Alonso y cols., 2009*) como por su relevancia para el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas (*Trinidad y cols., 2009*).

Patrón de expresión de Eph/EFN en células B-LLC y en células B sanos

A la vista del aumento del número de publicaciones que apuntaban una expresión diferencial de algunas Eph/EFN en cánceres humanos y líneas tumorales (*Hafner y cols., 2003; Brantley-Sieders y cols., 2004; Wimmer-Kleikamp y Lackmann, 2005*) y su evidente papel en la fisiología del sistema inmune (*Luo y cols., 2001; Luo y cols., 2002; Munoz y cols., 2002; Sharfe y cols., 2002; Yu y cols., 2003; Luo y cols., 2004; Munthe y cols., 2004; Munoz y cols., 2006*), aconsejaban evaluar su importancia en un síndrome linfoproliferativo crónico (SPLC) que, como la LLC, atraviesa distintas etapas clínicas durante la evolución de la enfermedad, con un pronóstico distinto en cada caso, lo que incrementa el interés por encontrar más y mejores marcadores de los comúnmente utilizados (*D'Arena y cols., 2003; Rassenti y cols., 2004; Moreno y Montserrat, 2008*). Trabajos previos a éste habían detectado algunas de estas moléculas, concretamente EphA3, EphB4 y EFNB2, en líneas celulares pro-B (*Steube y cols., 1999*) y pre-B (Leucemia Linfática Aguda, LLA) (*Boyd y cols., 1992*), pero no existía un abordaje directo en relación con la clínica de los cánceres linfoides. Por ello, nuestro primer objetivo fue elaborar un perfil de la expresión de estas moléculas en la B-LLC y de establecer las posibles correlaciones entre el perfil obtenido y los parámetros clínicos de la enfermedad, en comparación con los obtenidos en células B sanas, comparación que otros autores habían realizado anteriormente con otras moléculas (*Klein y cols., 2001; Rosenwald y cols., 2001; Damle y cols., 2002; Huttman y cols., 2006*), evaluando así si las células B-LLC podrían servir, además, como herramienta de aproximación al estudio de la biología de las células B en relación con Eph/EFN.

Este análisis reveló la ausencia de algunas Eph/EFN como EphA7, EFNA2, EFNA5, EFNB1 y EFNB3, en todos los tipos celulares B analizados, sanos y leucémicos, ni siquiera tras ninguna de las estimulaciones realizadas a los primeros. Si bien no podemos descartar la existencia de nuevas formas de *splicing* alternativo que pudieran no ser amplificadas por los cebadores diseñados en ese momento, sí podemos asegurar que estos cebadores amplifican todos los productos de RT-PCR para los que fueron diseñados, usando para esto muestras control (datos no mostrados), pudiéndose descartar, por tanto, su expresión en las muestras tanto B-LLC como B sanos, estudiadas. Por otra parte, nuestros resultados, como otros autores ya habían encontrado (*Aasheim y cols., 1997*), confirman la ausencia de expresión de EphA7 en linfocitos maduros, limitándose la expresión de este receptor a estadios inmaduros,

así como la expresión constitutiva de EphA4, dentro del marco del desarrollo normal de linfocitos B, tanto durante la linfopoyésis como en las células maduras (*Aasheim y cols., 1997*).

EFNA4 resultó ser la única molécula que se expresa en la totalidad de las muestras analizadas, identificándose dos variantes, 1 y 2 consecuencia de *splicing* alternativo de ARNm, aquí denominadas isoformas larga (L) y corta (S), respectivamente, pero en ningún caso la variante 3 previamente descrita en linfocitos B procedentes de amígdala humana (*Aasheim y cols., 2000*). El análisis de la secuencia peptídica potencial, codificada por la isoforma S, indica la ausencia del dominio GPI presente en la isoforma de membrana o L, así como del dominio transmembrana u otros de anclaje a la misma siendo, por tanto, muy probable que esta molécula se corresponda con una isoforma soluble de la EFNA4. La cuantificación realizada para ambas isoformas mediante Q-RT-PCR, mostró que la proporción entre ambas puede variar en B sanas circulantes tras la estimulación, expresando mayoritariamente la isoforma de membrana EFNA4-L antes de la estimulación pero EFNA4-S, tras estímulo. En el caso de células B de ganglios linfáticos, B-GL, la expresión de ambas isoformas es más similar, como sucedía en células B-LLC-SP, en consonancia con la hipótesis de que estas células leucémicas corresponden a células activadas (*Damle y cols., 2002; Hultdin y cols., 2003; Ghia y Caligaris-Cappio, 2006*).

Además de la presencia de la EFNA4 en todas las muestras analizadas, también destaca la alta expresión de EphA10 y EphB6 en B-LLC-SP; lo que de nuevo apoya que la mayoría de B-LLC-SP se encuentran en estado activado, al expresarse ambas moléculas en todas las B-GL y en células B-SP activados *in vitro*, tanto a través como independientemente de BcR. Ambos receptores tienen en común la ausencia de determinados aminoácidos esenciales, muy conservados, pertenecientes al dominio quinasa, resultando para EphB6, y presumiblemente también en el caso de EphA10, una pseudoquinasa (*Pasquale, 2005*). EphA10 se describió recientemente en humanos (*Aasheim y cols., 2005*), y no se conoce ni su función, ni su presencia en linfocitos B. EphB6, relacionada con la señalización celular en linfocitos T (*Luo y cols., 2001; Luo y cols., 2002; Freywald y cols., 2003; Luo y cols., 2004*), tampoco había sido descrita anteriormente. En contraposición a la mayoría de miembros detectados, la expresión de EphA8 no parece cambiar con la activación linfocitaria pero,

curiosamente, estaba ausente en más de un 70% de las muestras LLC analizadas, a pesar de su expresión constitutiva en linfocitos B sanos. Nuestros resultados no permiten determinar si la expresión diferencial de esta molécula en LLC pudiera estar relacionada con una variante de la enfermedad.

El perfil de expresión de Eph/EFN en las muestras LLC analizadas, tanto provenientes de sangre circulante como de las adenopatías, es heterogéneo en su conjunto y podría responder a un estado de reciente activación como parecen presentar estas células durante la enfermedad, un concepto relativamente reciente (*Keating y cols., 2003*) que contrasta con el concepto clásico aceptado con anterioridad, que las consideraba como células inertes e inmunodeprimidas y fenotípicamente homogéneas (*Dameshek, 1967*). La estimulación *in vitro* de linfocitos B circulantes de individuos sanos, así como los linfocitos B obtenidos de ganglios reproducían, casi en su totalidad, el espectro de miembros Eph/EFN encontrados en la LLC, apoyando esta hipótesis. Consiguientemente, nuestros resultados ponen de manifiesto que la expresión de Eph/EFN en linfocitos B está íntimamente relacionada con el estado de activación linfocitario en respuesta a la estimulación de BcR por antígeno, o a la estimulación inespecífica a través de otros receptores, como aquéllos que unen el LPS. En términos generales, ambas vías resultan prácticamente en la regulación de los mismos Eph/EFN. Este hecho, sugiere un papel de antígenos en el desarrollo y/o evolución de la LLC como han indicado otros autores (*D'Arena y cols., 2003; Munk Pedersen y Reed, 2004; Ghia y Caligaris-Cappio, 2006; Tobin y cols., 2006; Ghia y cols., 2008*) y pone de manifiesto una regulación de Eph/EFN en linfocitos en íntima relación con la respuesta inmune. Concretamente, el análisis de BcR en LLC ha puesto de manifiesto la utilización preferencial de ciertos segmentos génicos VDH Ig (*Fais y cols., 1998*), la presencia de BcR estereotipados cuyos CDR3 podrían reconocer idénticos antígenos así como la afinidad de estos BcR por ciertos auto-antígenos, presumiblemente mimetizados por antígenos bacterianos o víricos (*Fais y cols., 1998; Chiorazzi y cols., 2005; Herve y cols., 2005; Ghia y Caligaris-Cappio, 2006; Tobin y cols., 2006; Ghia y cols., 2008*), potenciando la hipótesis de la infección en el posible origen de la enfermedad. También, la presencia de mutaciones somáticas en los genes IgV_H del BcR en algunos casos, sugiriendo una respuesta antigénica T dependiente, ha sido relacionada con un mejor pronóstico, lo que dio lugar a una hipótesis que considera la existencia de dos tipos de LLC, de acuerdo a su origen y posterior evolución de la enfermedad, parcialmente correlacionando con el estado mutacional de genes IgV_H (*Criel y cols., 1999; Hamblin, 2002;*

D'Arena y cols., 2003; Keating y cols., 2003). Consiguientemente, sería interesante una mejor caracterización molecular de las muestras LLC correlacionando los perfiles de Eph/EFN expresados con el estado mutacional de IgV_H, algo que actualmente estamos abordando.

Llama la atención, por otro lado, que las B-LLC circulantes respecto de las aisladas de adenopatías presentan ciertas características únicas en relación con la expresión de Eph/EFN. Si bien el número de muestras analizado de éstas últimas es demasiado bajo en comparación con el de muestras de sangre periférica, nuestros resultados sugieren que las B-LLC circulantes podrían haber emigrado recientemente, conservando parte de su perfil Eph/EFN adquirido en la adenopatía. No obstante, podrían existir cambios en las B-LLC en el tránsito entre ambas localizaciones, que potencialmente podrían ser, origen o consecuencia del mismo. En este sentido, por ejemplo, la expresión por citometría de flujo de EFNA4 en B-LLC de adenopatías, parecía ser sensiblemente menor que la presente en células circulantes (no mostrado), algo que, como discutiremos posteriormente, podría estar relacionado con su salida de los tejidos linfoides. Sería necesario un análisis más amplio de las B-LLC procedentes de adenopatías y médula ósea en comparación con las de sangre periférica de los mismos pacientes (estudios en curso), para confirmar esta hipótesis, pero también, porque es comúnmente aceptado que es en estas localizaciones donde las B-LLC residen durante su desarrollo y donde otros autores han encontrado importantes diferencias en relación a los datos obtenidos de sangre periférica (*Dick y Maca, 1978; Panayiotidis y cols., 1996; Ghia y Caligaris-Cappio, 2000; Munk Pedersen y Reed, 2004*).

Puesto que la expresión de Eph/EFN en diferentes tipos de tumores humanos ha sido relacionada con la carga y la diseminación tumoral (*Hafner y cols., 2003; Brantley-Sieders y cols., 2004; Wimmer-Kleikamp y Lackmann, 2005*) también su perfil de expresión en B-LLC circulantes podría estar relacionado con parámetros de la enfermedad. El análisis de la correlación de los perfiles de expresión Eph/EFN con las características clínicas de los pacientes y marcadores aquí considerados, y a falta de otros en curso como el estado mutacional de IgV_H o los niveles séricos de indicadores de actividad tumoral (LDH, TK y β 2-MG) o la citogenética, pone de manifiesto que ciertos miembros podrían ser útiles en el pronóstico de la enfermedad. Así, la presencia de EFNA1, EFNA3 ó EphB1 se asocia con los pacientes que no presentan linfadenopatías o pertenecen a estadios de bajo riesgo;

igualmente la presencia de EphA1 se asocia con los pacientes que presentan una linfocitosis menos severa y una menor expresión de ZAP-70; otras, como EphB6 y EFNB2, se asocian con pacientes con linfocitosis severa, alto contenido en ZAP-70 y peor evolución. Desconocemos, no obstante, cómo es la evolución de estos marcadores en relación con la enfermedad, por lo que actualmente estamos realizando un seguimiento de la misma con nuevas valoraciones Eph/EFN en los pacientes aquí estudiados.

En el caso particular de EFNA4, los datos obtenidos mediante Q-RT-PCR muestran que una mayor cantidad de EFNA4-L se asocia significativamente con los pacientes que no presentan linfadenopatías, se encuentran en estadios de riesgo bajo o se mantienen estables. Por el contrario altos niveles de la isoforma EFNA4-S correlacionan significativamente con pacientes que presentan linfadenopatías o se encuentran en estadios de riesgo intermedio. Estos datos sugieren que los niveles de transcritos para ambas isoformas podrían equilibrarse entre ellos, lo que podría estar asociado con la presencia/ausencia de adenopatías aunque, nuevamente, es necesario un seguimiento de la expresión en relación con la evolución clínica de estos pacientes para confirmarlo. La falta de relación entre los niveles de estas isoformas y el contenido de ZAP-70, como indicador de mal pronóstico, no estaría en desacuerdo con su asociación a aparición de linfadenopatías, puesto que no se ha encontrado esta asociación entre ZAP-70 y esta condición clínica (*Caligaris-Cappio, 2000*). Si bien la presencia de adenopatías podría contribuir a la enfermedad y de hecho su aparición normalmente es motivo para iniciar tratamiento, sin embargo, no se contempla actualmente como un criterio de mal pronóstico, aunque sí de alerta y tratamiento; de hecho no se han encontrado asociaciones significativas entre esta condición clínica y marcadores de mal pronóstico como la ya comentada alta expresión de ZAP-70 ni el estado mutacional de IgV_H o una evolución clínica muy desfavorable (*Moreno y Montserrat, 2008*). No obstante, el desarrollo de adenopatías está vinculado a una mayor diseminación de la enfermedad, una condición de la patobiología de la misma que conlleva riesgos por su presumible papel en la proliferación y supervivencia de las células leucémicas y la consiguiente aparición de variantes de la enfermedad, alteraciones citogenéticas o resistencia a los tratamientos (*Munk Pedersen y Reed, 2004*).

Como hemos discutido antes, la expresión de ARNm para EphB6 y EFNA4 se postulaban como marcadores en el pronóstico, pero la posibilidad de que estas moléculas pudieran ser detectadas en la membrana celular, con las mismas asociaciones con los parámetros clínicos evaluados, presentaba un especial atractivo por su posible utilidad clínica. Los análisis realizados mediante citometría de flujo, evaluando la presencia de EphB6 en membrana, mostraron las mismas asociaciones que los transcritos para EphB6, es decir, con pacientes con linfocitosis severa, alto contenido en ZAP-70, éste último parcialmente relacionado con ausencia de mutaciones en los genes de la IgV_H, y cuya enfermedad progresa con un pronóstico desfavorable (*Wiestner y cols., 2003; Orchard y cols., 2004*). Nuestros análisis de ZAP-70 ARNm mostraban que los pacientes con peor pronóstico presentaban los niveles más altos de expresión de esta molécula sugiriendo, por tanto, que la expresión de EphB6 en B-LLC podría ser un marcador indirecto para el pronóstico de la enfermedad, lo que actualmente estamos evaluando. Además la presencia/ausencia de esta molécula permite la discriminación entre las células B leucémicas y las sanas, puesto que en estas últimas esta molécula no se expresa. El análisis por citometría de flujo para EFNA4 también permite discriminar distintos niveles de expresión en las muestras LLC estudiadas, todas ellas presentando sobre-expresión de esta molécula en relación a linfocitos B sanos. El análisis por citometría de flujo permite, además, discriminar pacientes en un estadio de riesgo bajo (alta expresión de EFNA4) frente a pacientes en riesgo intermedio o alto (baja expresión de EFNA4) con presencia de linfadenopatías.

La cuantificación de EFNA4 en el suero de los pacientes mediante ELISA mostró ser una técnica muy sensible, detectando niveles muy bajos, claramente por encima de los encontrados en individuos sanos. La correlación encontrada con la presencia/ausencia de linfadenopatías y su relación directamente proporcional con la linfocitosis de los pacientes, podría ser utilizada como un indicador temprano de LLC. En este sentido, sería necesario determinar si su presencia en suero se restringe a LLC o podría estar presente en otros SLPC, como linfoma de manto o folicular, de características clínicas muy distintas, pero en ocasiones fenotípicamente similares, cuando existe expresión periférica o leucemizan. Por su posible relación con el diagnóstico temprano de LLC, también sería necesario determinar si la presencia de linfocitosis monoclonal B cursa con niveles altos de esta molécula, dado lo complicado de detectar esta población en análisis clínicos rutinarios por su bajísima

frecuencia en sangre periférica (<0,1%) y su posible relación con un diagnóstico temprano de LLC (Nieto y cols., 2009; Shim y cols., 2010; Almeida y cols., 2011).

La relación entre la forma soluble encontrada en suero de pacientes y la isoforma de ARNm EFNA4-S, a falta de su confirmación por otros métodos de clonaje y secuenciación no llevados a cabo en este estudio, sugieren que ambas podrían corresponder a la misma molécula. La presencia de variantes resultantes de un *splicing* alternativo de ARNm ha sido detectada en algunas otras Eph/EFN (Lai y cols., 1999; Holmberg y cols., 2000; Aasheim y cols., 2005), siendo relativamente frecuente, y se ha sugerido que las isoformas solubles podrían representar un mecanismo de regulación de las interacciones Eph/EFN, funcionando a modo de agonistas o antagonistas naturales, modulando el grado de agrupación de los receptores/ligandos en la membrana celular y tanto la intensidad como el sentido de la señal (Pasquale, 2005). Tampoco podemos descartar que parte de la EFNA4 en sueros pudiera corresponder a un procesamiento de la forma de membrana. De hecho, el corte de ligandos EFN por proteasas de la familia kuzbanian ha sido demostrada para algunos miembros y en relación con mecanismos de terminación de la señalización Eph/EFN (Pasquale, 2005).

En cualquier caso, la cuantificación, a todos los niveles, de cada una de las dos isoformas parece indicar que la expresión de ambas podría estar ligada, sugiriendo este supuesto ligamiento un mecanismo de regulación. Así, teniendo en cuenta las asociaciones obtenidas con los parámetros clínicos podríamos relacionar las isoformas de EFNA4 y la condición clínica de los pacientes en relación al desarrollo de adenopatías y al estadio de riesgo (Figura 47). En esta representación se sugiere que un incremento en la cantidad de EFNA4 soluble, supuestamente a costa de la isoforma de membrana, podría relacionarse con progresión hacia un pronóstico más desfavorable ligado al desarrollo de linfadenopatías.

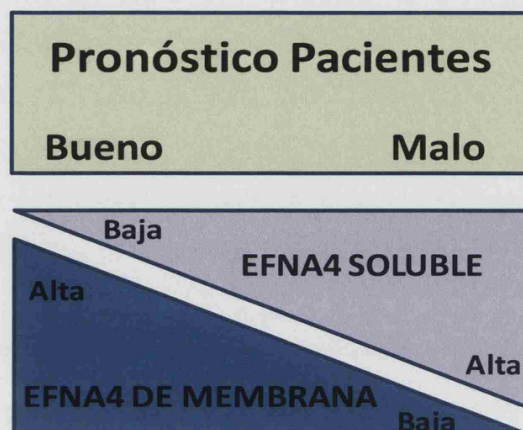


Figura 47. Modelo hipotético de equilibrio de las isoformas de EFNA4 y su posible relación con el pronóstico clínico de los pacientes de LLC.

Papel de la interacción EphA2-EFNA4 en la diapédesis linfocitaria

El tráfico de linfocitos entre la sangre y los tejidos es un proceso esencial para asegurar la homeostasis linfoide (Aurrand-Lions y cols., 2002; Luster y cols., 2005; Bajenoff y cols., 2007; Germain y cols., 2008). Los linfocitos migran a (entrada) o desde (salida) los tejidos linfoides a nivel de estructuras vasculares especializadas llamadas vénulas de endotelio alto (HEV) que albergan la maquinaria molecular para acoger, tras comunicarse con los linfocitos potencialmente migrantes, los procesos de migración transendotelial (Luster y cols., 2005). En muchos estados patológicos, el reclutamiento selectivo de leucocitos se lleva a cabo en el ámbito de endotelios “instruidos” como consecuencia de señales dependientes de procesos inflamatorios incluyendo citocinas pro-inflamatorias (Luster y cols., 2005; Rodrigo Mora y Von Andrian, 2006). Un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares que orquestan estos procesos es beneficioso para el desarrollo de nuevas terapias en muchas enfermedades humanas relacionadas con este proceso.

Las células B-LLC presentan una capacidad de migración transendotelial parcialmente disminuida ligada al papel autónomo de la sobreexpresión de EFNA4

La asociación encontrada entre la presencia de linfadenopatías y una menor expresión de EFNA4 en la superficie de las B-LLC circulantes de estos pacientes en relación a las muestras de pacientes que no presentaban esta característica clínica, sugería que esta molécula podría estar relacionada funcionalmente con esta característica clínica de la enfermedad. Tradicionalmente, la infiltración de tejidos linfoides que tiene lugar en la LLC ha sido relacionada con el desarrollo de linfadenopatías, si bien esta asociación no estaba del todo demostrada. Concretamente, los primeros estudios de esta enfermedad habían puesto de manifiesto que en ausencia de linfadenopatía evidente (>1 cm), los ganglios de los enfermos podían contener algunas células leucémicas (Dick y Maca, 1978). Posteriormente, el reconocimiento de los pseudofolículos en las adenopatías como centros linfoproliferativos sugirió que esta condición clínica podía deberse a la proliferación y posterior acumulación de las LLC en los ganglios infiltrados con invasión de todo el tejido y engrosamiento de los ganglios por incremento de la masa tumoral. Considerando esta última hipótesis, y por la importancia que cobraba la presencia de linfadenopatías en el concepto de evolución de la enfermedad, numerosos trabajos apoyaban una alta capacidad de migración de las B-LLC

desde el torrente circulatorio hacia los tejidos linfoides, puesto que la proliferación en estos tejidos no parecía explicar *per se* la alta masa tumoral. Estos conceptos clásicos son hoy por hoy aún materia de intenso debate y, consiguientemente, de estudio. En este sentido, cabe destacar que una carga elevada de células B-LLC en sangre periférica es una característica de la enfermedad y, no obstante, el desarrollo de linfadenopatías es un fenómeno más o menos tardío en muchos casos sugiriendo, por tanto, que la entrada de las B-LLC debía estar comprometida y/o regulada por mecanismos no del todo conocidos.

Los análisis de expresión de distintos receptores EphA para EFNA4 en las adenopatías estudiadas ponen de manifiesto que numerosos vasos CD31⁺ expresan fuertemente EphA2. Otras EphA analizadas como EphA3, EphA4 y EphA8, aparecen de forma dispersa en el parénquima de los ganglios linfáticos, sugiriendo que EphA2 debe ser el principal receptor que interaccione con las células EFNA4⁺ circulantes. No obstante, cabe la posibilidad de que otras o incluso algunas de estas mismas, detectadas en las células endoteliales mediante RT-PCR, también pudieran intervenir regulando la interacción. Por otra parte, la morfología cuboidal de estas células endoteliales, CD31⁺- EphA2⁺, apuntan que posiblemente parte de estos vasos fueran HEV, algo que estamos actualmente evaluando. Estas vénulas post-capilares modificadas constituyen la principal ruta de entrada de los linfocitos procedentes del sistema sanguíneo a los ganglios linfáticos en su recirculación, apoyando la hipótesis de que la interacción EFNA4-EphA2 esté implicada en la TEM. Esta hipótesis se vio reforzada por los análisis realizados posteriormente mediante RT-PCR de las células endoteliales procedentes de los diferentes ganglios linfáticos evaluados: sanos, reactivos y con infiltración B-LLC, poniendo de manifiesto una expresión mayoritaria de EphA2, no sólo en condiciones patológicas sino también fisiológicas. Las adenopatías de LLC presentan un aumento de la proporción de estructuras vasculares, lo que ha sido relacionado con procesos de neoangiogénesis asociados al tumor. Dicho vasos, como muestra nuestro estudio, son mayoritariamente EphA2⁺ con una fuerte expresión. Por el contrario, su presencia en ganglios relativamente sanos como los aquí utilizados a modo de controles (reactivos y centinela) está más restringida sugiriendo que la expresión de EphA2 en HEV podría estar asociada a una migración, entrada y/o salida, selectiva de linfocitos, hipótesis que actualmente estamos evaluando en nuestro laboratorio.

Como tal, la intra/extravasación de linfocitos es un complejo proceso de búsqueda del camino migratorio regulado por numerosas señales para poder controlar el movimiento selectivo de distintas subpoblaciones de células inmunes hacia y desde distintos tejidos (Dunon y cols., 1996; Aurrand-Lions y cols., 2002; Imhof y Aurrand-Lions, 2004; Luster y cols., 2005). En el contexto de la extravasación, los linfocitos y las células endoteliales intercambian señales bidireccionales que conducen a alteraciones mutuamente dependientes en sus respectivos comportamientos (Muller, 2009; Wittchen, 2009). Actualmente, se reconoce como un proceso de adhesión en cascada compuesto de varios pasos sucesivos de contactos condicionales linfocito-endotelio: 1) contacto inicial y rodamiento, 2) adhesión firme, 3) rastreo y, 4) diapédesis o transmigración seguida por invasión del tejido (Dunon y cols., 1996; Aurrand-Lions y cols., 2002; Imhof y Aurrand-Lions, 2004; Luster y cols., 2005). Los dos primeros pasos son los más relevantes en cuanto a “la toma de decisiones”, mientras que los pasos siguientes se refieren más a la propia transmigración en sí. Todo el proceso está determinado por el equilibrio de las señales extracelulares derivadas de los tejidos involucrados, sobre todo en forma de moléculas solubles atrayentes y/o repelentes (quimiocinas y otros) y factores mecánicos como el nivel del flujo sanguíneo (Salmi y Jalkanen, 2005).

En relación con ello, y para facilitar el análisis de los posibles efectos en la TEM presumiblemente mediados por la interacción EFNA4-EphA2 que se establece entre linfocitos y células endoteliales, se decidió evaluar por separado algunas de las etapas implícitas en este proceso. Para discriminar si los posibles efectos provocados por esta interacción tenían lugar sólo en condiciones patológicas o también en fisiológicas, se comparó, en cada una de estas etapas, el comportamiento de celular B-LLC-SP frente al de linfocitos B-SP.

Una de esas etapas es la capacidad de los linfocitos de adherirse al endotelio. Nuestros resultados muestran una menor capacidad de los linfocitos B-LLC-SP para adherirse al endotelio frente a la presentada por los B-SP. Estos datos parecían estar de acuerdo con evidencias indirectas previamente mostradas por Bazerbashi, quién ya en 1978 (Bazerbashi y cols., 1978) apuntó que las células B-LLC-SP, marcadas con ⁵¹Cr, abandonaban la circulación más lentamente que las B-SP marcadas de la misma manera y con Dormer, quién en 1983 (Dormer y cols., 1983) evaluó la supervivencia de las B-LLC-SP marcadas con timidina-[H3] en

la circulación de los pacientes durante muchas semanas sin evidencias de extravasación. Sin embargo, no todas las muestras B-LLC-SP analizadas reflejaron la misma reducción en su capacidad de adhesión al endotelio. Al desglosar los resultados en base a la presencia/ausencia de linfadenopatías se observa, que las muestras procedentes de pacientes que presentaban linfadenopatías reflejaban una mayor capacidad de adhesión al endotelio que aquéllas procedentes de pacientes que no las presentaban. Al desglosar de nuevo estos resultados, ahora en base al grupo de riesgo al que pertenecían, se observó que la menor capacidad de adhesión la registraban las muestras procedentes de pacientes clasificados como bajo riesgo, mientras que aquéllos que la mantenían sin descensos significativos pertenecían a los grupos de riesgo intermedio y alto. Este incremento en la adhesión al endotelio en estadios más avanzados de la enfermedad había sido observado por otros grupos (*Stauder y cols., 1993; Vincent y cols., 1996; Till y cols., 2002*). Por otro lado, al evaluar el contenido de EFNA4 en membrana de cada una de las muestras, se observó una relación inversamente proporcional entre ésta y la capacidad de adhesión, sugiriendo una posible función de ésta molécula en relación con la capacidad de TEM.

Como ya se ha mencionado, es a menudo difícil entender la señalización mediada por Eph y EFN porque tanto ligandos como receptores expresados en las células implicadas en la interacción pueden transmitir señales: hacia la célula que expresa la Eph (señal *forward*) y/o a la portadora de la EFN (señal *reverse*) (*Cowan y Henkemeyer, 2002; Himanen y Nikolov, 2003b; Klein, 2004; Poliakov y cols., 2004; Pasquale, 2005; 2008*), y la posible función autónoma o no autónoma de la célula en el proceso (*Davy y Soriano, 2005*). El uso de proteínas de fusión, homodímeros de los dominios extracelulares de unión de Eph/EFN unidos a fragmentos Fc de IgG humana, conlleva el bloqueo de la posible señalización bi-direccional pero, además, puede provocar señalización en la célula que los une como ha sido previamente demostrado para EFN1-Fc (*Stein y cols., 1998*). Este tipo de abordaje puede por tanto, dar lugar a un desequilibrio en la señalización bi-direccional estudiada, EphA2-EFNA4 en nuestro caso, permitiendo evaluar el papel autónomo de cada molécula en la interacción Eph-EFN si son suministrarlas separadamente a cada tipo celular. Con el fin de evaluar *in vitro* la importancia de cada uno de los tipos celulares implicados en los ensayos realizados, células endoteliales HUVEC o células B, se pre-incubaron por separado con homodímeros solubles recombinantes de la porción extracelular de EFNA4 ó EphA2, respectivamente, en las que el polipéptido poli-Hist nos permitió su posterior análisis por citometría de flujo. De esta

manera, aseguramos que las interacciones EphA2-EFNA4 están bloqueadas en el co-cultivo y que una eventual señalización sólo se llevaría a cabo en la población pre-incubada. Ambas, HUVEC y células B pueden expresar otros miembros Eph/EFN con capacidad de unión a los homodímeros correspondientes recombinante como EphA4, en el caso de HUVEC activada con TNF- α , y varios ligandos EFNA, en el caso de la B-LLC o de células B normales. No obstante, ensayos de unión de las proteínas demostraron que las células HUVEC unían EFNA4-Fc principalmente a través de EphA2, según se determinó por microscopía confocal, y que las células LLC principalmente unían la EphA2-Fc a través de EFNA4, según se determinó por citometría de flujo (Trinidad y cols., 2009).

El tratamiento con EFNA4-Fc pre-agregada sobre el endotelio, que podría desencadenar señalización *forward*, principalmente vía EphA2, provocó un aumento en el porcentaje de células adheridas respecto al del control sin tratar, tanto para células B-LLC-SP como para linfocitos B-SP, confirmando el papel de esta interacción en la comunicación linfocito-endotelio, tanto en el proceso patológico estudiado como en condiciones normales. Por el contrario, el tratamiento con EphA2-Fc sobre linfocitos B, que podría desencadenar señalización *reverse*, principalmente vía EFNA4, produjo un descenso generalizado en el porcentaje de células adheridas, aunque de diferente intensidad dependiendo de la muestra. Mientras que en las B-SP se observó un discreto descenso, el observado en B-LLC-SP era mucho más drástico y dependiente de la cantidad de EFNA4 expresada en su membrana. Las reducciones encontradas en las muestras con cantidades intermedias y altas de EFNA4 resultaron similares, sufriendo la menor reducción en su adhesión al endotelio aquellas muestras que presentaban baja cantidad de este ligando en su membrana. Este efecto podría deberse a la regulación de la adhesión observada en estas células por una posible señalización *reverse* a través de EFNA4 agregada con EphA2-Fc y que podría darse a través de algunas de las moléculas conocidas por estar implicadas en las interacciones linfocito-endotelio clásicas como CD62-L, CD44, y las integrinas CD11a, CD49d, CD18 y CD29.

A tenor de los resultados obtenidos, la señalización *forward*, parece promover la adhesión entre ambos tipos celulares, mientras que la señalización *reverse* parece estar implicada en procesos de repulsión. En otros sistemas, como el crecimiento de neuronas sensitivas durante el desarrollo en la piel del ratón, la capacidad de la EFNA4 para provocar

repulsión celular ya había sido descrita (Moss y cols., 2005), lo que apoya, por tanto, la hipótesis propuesta: En el contacto linfocito-endotelio, la señalización vía EFNA4 es capaz de promover señales de repulsión.

Los ensayos de TEM muestran una mermada capacidad de los B-LLC-SP, tanto de adhesión como de trans migración, como sugerían estudios *in vitro* previos (Stauder y cols., 1993; Chen y cols., 1999; Gu y cols., 2001). Además estos descensos, en comparación con las capacidades mostradas por los B-SP, aumentaban a medida que lo hacía la cantidad de EFNA4 en membrana, de acuerdo con lo discutido hasta el momento. El tratamiento con EFNA4-Fc sobre HUVEC afectó de manera similar a B-LLC-SP y a B-SP, incrementando su adhesión y su TEM, sugiriendo que la señalización *forward*, principalmente vía EphA2 hacia el endotelio promueve la TEM; mientras, el tratamiento de EphA2-Fc sobre linfocitos provocó, solo en parte, efectos similares. Ambas células, sanas y leucémicas, redujeron su porcentaje de adhesión, sin embargo, mientras que las B-SP aumentaban el porcentaje de células trans migradas, en B-LLC-SP este porcentaje se reducía. Estos resultados sugieren que: 1) la señalización *reverse*, principalmente vía EFNA4, hacia el linfocito promueve repulsión y 2) que dicha repulsión, aun existiendo tanto en células sanas como leucémicas, era mayor en estas últimas.

Los ensayos de migración llevados a cabo con quimiocinas, tanto con monocapas endoteliales como en ausencia de ella, mostraron en primera estancia que las células B evaluadas, independientemente de su procedencia sana o leucémica, presentan mayor migración cuando su camino supone atravesar la barrera endotelial. De acuerdo a lo ya observado y discutido, de nuevo las células B-LLC-SP muestran menor capacidad, tanto de migrar como de trans migrar, en comparación con la mostrada por los linfocitos B-SP. La evaluación en respuesta a las quimiocinas CCL19, CXCL12 y CXCL13, reveló que, por ese orden, eran capaces de inducir un aumento de migración de los B-LLC-SP evaluados. En este sentido, los resultados apuntan a la existencia de una posible cooperación entre CCL19 y la señalización *forward* a través de EphA2, lo que podría contribuir al incremento de TEM en células B-LLC-SP. Dicha cooperación parece no existir en el caso de las otras quimiocinas evaluadas, CXCL12 y CXCL13; de hecho las células B-LLC-SP bajo esas condiciones experimentan una disminución en su capacidad de migrar trans endotelialmente, pudiendo

atribuir este efecto al bloqueo de la interacción EFNA4-EphA2, linfocito-endotelio. En otros sistemas también se ha encontrado que la señalización vía Eph/EFN podría modular la migración en respuesta a gradientes de quimiocinas. Concretamente, en linfocitos T a través de señalización *forward* de EphA3 sobre la quimioatracción mediada por CXCL12 (Sharfe y cols., 2002) o a través de EphA1 sobre CCR7 (Hjorthaug y Aasheim, 2007) pero también a través de la señalización *reverse*, como en células neuronales mediada por EFN2 y CXCR4 (Sharfe y cols., 2002)

La valoración conjunta de los resultados, acerca del tratamiento con EphA2-Fc sobre linfocitos B junto con las quimiocinas, reveló que tanto en ausencia como en presencia de la monocapa endotelial, la señal *reverse*, presumiblemente a través del ligando EFNA4, parece capaz de modular de manera autónoma la quimiotaxis mediada a través de CCR7, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, aunque de nuevo, esta señal *reverse* parece intensificarse en condiciones patológicas, no siendo capaz de inhibir, al menos no significativamente, la migración de linfocitos B-SP en presencia de células endoteliales. No obstante, esta cooperación sólo parece tener lugar entre CCR7 y la señalización *reverse*, puesto que la migración en la que intervienen CXCR4 y CXCR5, no se vio afectada en ausencia de endotelio, pudiéndose atribuir la disminución encontrada en presencia de la monocapa a la interrupción, a través de la mencionada vía EFNA4-EphA2, en la comunicación linfocito-endotelio, como también se ha postulado para la señalización *forward*, siendo además los efectos encontrados de la misma índole para ambos tratamientos.

La interacción EphA2-EFNA4 podría regular la adhesión/separación en sitios de contacto discretos entre ambos tipos celulares, como pueden ser los podosomas invasivos, estructuras adhesivas dinámicas utilizadas por los linfocitos para rastrear la superficie endotelial (Carman y cols., 2007). En estos microcontactos, la repulsión mediada por EphA2-EFNA4 podría servir para inducir separación de superficies celulares en contacto de modo que la terminación de la interacción EphA2-EFNA4 podría ocurrir a través de vesículas de endocitosis, uno de los mecanismos descritos como terminación de la señalización en estas moléculas (Himanen y Nikolov, 2003a; Pasquale, 2005; Himanen y cols., 2007; Pasquale, 2008), considerando la rápida internalización de los complejos EphA2-EFNA4 mostrada por las HUVEC al tratarlas con complejos EFNA4-Fc-fluorocromo (Trinidad y cols., 2009). Por otra

parte, la señalización *reverse* de las EFNA puede ser modulada en la superficie celular mediante el corte del ligando de la superficie celular (Figura 7), a través de la acción de metaloproteasas como Adam10/Kuzbanian (Hattori y cols., 2000). Mediante este mecanismo, durante el crecimiento de los conos, las EphA, cambian su respuesta a las EFNA pasando de la adhesión a la repulsión. De igual forma las interacciones EphA2-EFNA4 entre el endotelio y las células B podrían ser activamente formadas y culminadas con el proceso de TEM.

A modo de resumen en la Figura 48 se propone un modelo hipotético, válido tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, que ilustra cómo la interacción EphA2-EFNA4 podría regular la TEM de los linfocitos B. La magnitud de la señalización *reverse* en los linfocitos mediada por EFNA4, determinaría la naturaleza de la respuesta, de manera que al sobrepasar un determinado umbral, más fácil de alcanzar por las células B-LLC al sobreexpresar este ligando en su membrana, se generarían procesos de repulsión, cuya finalidad sería terminar la señal de adhesión promovida, entre otras, por la señal *forward*, presumiblemente a través del receptor EphA2 del endotelio. En otros sistemas se ha observado que la magnitud de la señalización Eph/EFN está determinada por el grado de agrupamiento, provocando respuestas opuestas, desde adhesión hasta repulsión (Poliakov y cols., 2004; Davy y Soriano, 2005; Himanen y cols., 2007; Pasquale, 2008). Este tipo de adhesiones/repulsiones resultan ser interacciones imprescindibles en procesos dinámicos como la TEM, que nos ocupa.

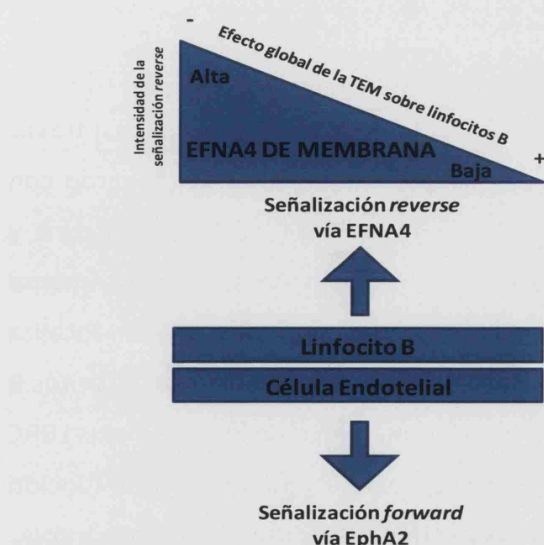


Figura 48. Modelo hipotético de la TEM de los linfocitos B, basado en la interacción EphA2-EFNA4 y el nivel de la intensidad de la señalización mediada por EFNA4. La señalización *forward* hacia el endotelio, vía EphA2, en asociación con moléculas, como ICAM-1, VCAM-1, etc., promovería la adhesión/transmigración de los linfocitos, adhesión/transmigración que finalizaría tras recibir la célula B el suficiente estímulo *reverse* vía EFNA4. Las células B-LLC alcanzarían más fácilmente esta condición al tener desregulada la señalización, debido a su sobreexpresión de EFNA4 en membrana.

Papel de EphA2 en la diapédesis linfocitaria

El tratamiento de las células HUVEC con EFNA4-Fc pre-agregada demuestra co-localización de EphA2 con moléculas de adhesión, especialmente con ICAM-1, sugiriendo que la interacción EFNA4-EphA2 podría regular la TEM a través de la asociación de EphA2 con ICAM-1. Dado el papel que los receptores Eph juegan en la determinación de la forma y en el movimiento celular a través de la reorganización del citoesqueleto (*Klein, 2004; Poliakov y cols., 2004; Pasquale, 2005; 2008*), y en base a los resultados aquí obtenidos, proponemos que EphA2 podría actuar conectando la estructura adhesiva formada por ICAM-1 y VCAM-1 con el citoesqueleto endotelial, durante la TEM. La participación de EphA2 en este proceso puede ser inferida indirectamente de los datos sobre la extravasación de leucocitos en otros sistemas, como el aumento de la expresión de EphA2 endotelial tras estímulos inflamatorios (*Ivanov y Romanovsky, 2006*) o como el aumento en la expresión de ICAM-1 en células endoteliales tratadas *in vitro* con trombina (*Chan y Sukhatme, 2009*). Como mostramos en nuestro estudio, la EphA2 se acumula en las uniones entre células endoteliales y se distribuye uniformemente en la superficie luminal de las monocapas tratadas con TNF- α . EphA2 agrega en la superficie de HUVEC tras la incubación con los complejos EFNA4-Fc y los complejos EphA2-EFNA4Fc se transcitaban hacia una localización basal peri-nuclear 60 minutos tras tratamiento. El proceso se acompaña de del secuestro de ICAM-1 y VCAM-1 en vesículas endoteliales que recuerdan a los orgánulos vesículo-vacuolares (VVO) o las caveolas que se han relacionado con la formación de un poro trans-celular durante la diapédesis de leucocitos a través de la célula endotelial (ruta transcelular) (*De Bruyn y cols., 1989; Millan y cols., 2006; Nieminen y cols., 2006; Carman y cols., 2007*).

La trans migración para-celular o entre células endoteliales de los leucocitos a través de los vasos endoteliales, se lleva a cabo en las uniones inter-endoteliales, de acuerdo con procesos dinámicos de reorganización de proteínas de unión como CD31 o VE-Cadherina y que ha dado en denominarse compartimento lateral de reciclaje (LBRC) recientemente descrito (*Muller, 2009*). En condiciones previas al co-cultivo, EphA2 se localiza abundantemente en las uniones entre células HUVEC pero se relocaliza en torno a linfocitos B trans migrando, lo que sugiere indirectamente que podría formar parte de los complejos LBRC implicados en la vía para-celular de TEM. EphA2 juega un papel determinante en la función barrera de endotelios y en epitelios (*Zantek y cols., 1999; Hess y cols., 2006; Larson y cols.,*

2008; Miura y cols., 2009) y está en íntima conexión con proteínas de unión como E-caderina. Por tanto, en un proceso de migración paracelular donde las uniones endoteliales deben relajarse para permitir el paso de leucocitos, EphA2 podría estar igualmente implicada, algo que estamos evaluando actualmente.

Por lo tanto, podría ser todavía apresurado y especulativo pero pensamos que la interacción EphA2-EFNA4 podría participar en la organización de la ruta migratoria durante la TEM a través de la regulación de la dinámica de podosomas y otras proyecciones celulares similares que extienden los linfocitos en la fase de rastreo y/o en la formación regulada de poros trans-celulares en las células endoteliales durante la migración transcelular y / o la ruta paracelular.

A partir de los modelos anteriormente planteados, y en base a los datos en común de cada uno de ellos, proponemos un nuevo modelo combinándolos (Figura 49). Este nuevo modelo propone que la forma soluble de la EFNA4 podría desempeñar un importante papel en la TEM puesto que esta molécula fomentaría la señalización *forward* hacia el endotelio, independientemente de la señalización *reverse* hacia el linfocito B, provocando un desequilibrio entre ambas señales, lo que podría facilitar la adhesión al endotelio de los linfocitos B y su posterior TEM, y por tanto, la colonización de nuevos tejidos y la diseminación de las células B.

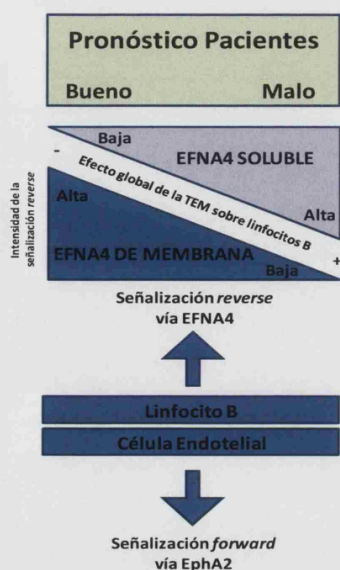


Figura 49. Modelo hipotético donde las isoformas soluble y membrana de EFNA4 se postulan como mediadoras importantes en la migración a los tejidos de las células leucémicas. Este modelo atribuye a la forma soluble de EFNA4 la capacidad de romper el equilibrio existente entre las señales *forward* y *reverse* lo que podría resultar en migración a través de endotelio, junto con una menor expresión de la isoforma de membrana.

A la vista de todos estos comentarios, que interpretan los resultados relacionados con parte del segundo objetivo propuesto en este trabajo, EFNA4 podría postularse, no sólo como marcador de pronóstico de la LLC, sino también como una molécula potencialmente terapéutica, en el sentido de que la señalización *reverse*, a través de ésta, bloquea significativamente la TEM *in vitro*, por lo que su regulación podría prevenir potencialmente la extravasación de las B-LLC-SP cuando ésta acontece. Obviamente, este control de la extravasación no representa toda la patogenia de la enfermedad y habría que considerar otros mecanismos que contribuyen al desarrollo de las linfadenopatías, como las tasas de proliferación y muerte (Messmer y cols., 2005).

Papel de EFNA4 en la supervivencia de B-LLC

Los mecanismos de supervivencia de las células B-LLC en los pacientes han sido y continúan siendo materia de estudio. Si bien inicialmente se consideró que las B-LLC debían portar un defecto intrínseco en el control de la apoptosis que explicaría su acumulación en los pacientes, estudios posteriores pusieron de manifiesto que las células morían de forma espontánea *in vitro* (Collins y cols., 1989), lo que sugería la implicación de factores solubles y/o contactos celulares entre las células leucémicas y los componentes estromales de los órganos donde se acumulan como los endotelios vasculares (Ghia y Caligaris-Cappio, 2000; Munk Pedersen y Reed, 2004).

En este estudio preliminar, hemos comprobado que si bien la supervivencia espontánea de células B-LLC *in vitro* es muy heterogénea, algunas de ellas presentan capacidades similares a las encontradas en células B sanas. Por tanto, cabría preguntarse a qué se deben estas diferencias y, de cara a la enfermedad, cuál podría ser su valor en el pronóstico y/o predictivo de cara a respuesta a tratamiento. En este sentido, no hemos encontrado una asociación clara entre estas distintas capacidades y distintos parámetros clínicos como linfocitosis, linfadenopatía, estadio Rai o ZAP-70, si bien un estudio reciente ha relacionado una mayor capacidad de supervivencia *in vitro* de las B-LLC con un peor pronóstico en pacientes de riesgo bajo ZAP-70^{neg} (Plander y cols., 2009). De cara a nuestros experimentos, y con el fin de considerar esas diferencias en supervivencia de las muestras LLC, decidimos utilizar muestras tanto de “alta” como de “baja” supervivencia, con el fin de que los resultados de co-cultivo no se vieran sesgados por haber utilizado preferencialmente uno u otro tipo y por determinar si presentaban una respuesta diferente, por sus posibles características intrínsecas o hasta donde fue posible, por la escasa disponibilidad de muestra, se trabajó finalmente con dos de cada tipo.

Un aspecto más que arroja nuestro estudio es el de demostrar que células endoteliales primarias (HUVEC) pueden ejercer una función pro-apoptótica sobre las células B, tanto sanas como leucémicas, a través de moléculas de la superficie celular, al menos durante las primeras horas de co-cultivo y especialmente en condiciones inflamatorias. En las mismas condiciones de co-cultivo, la supervivencia de células B co-cultivadas con la línea endotelial EA.hy926 aumentaba en relación a las células cultivadas solas, tanto sanas como B-

LLC. Una posibilidad que explicara estas diferencias entre ambos tipos de endoteliales podía estar en los factores solubles producidos por uno u otro tipo celular endotelial, hipótesis que quedó descartada cuando los co-cultivos se realizaron con las células endoteliales fijadas y las diferencias se mantuvieron. Puesto que nuestro estudio partía de la hipótesis de que las células endoteliales primarias promueven supervivencia en células B-LLC, como habían apuntado estudios previos realizados con distintas líneas endoteliales como EA.hy926 (*Long y cols., 1995*), ECV304 (*Moreno y cols., 2001*) o HME-1 (*Buggins y cols., 2010*) o se había sugerido indirectamente en otros (*Zucchetto y cols., 2009*), y puesto que nuestros resultados con HUVEC entraban en clara contradicción, continuamos investigando esta función endotelial de HUVEC en relación con LLC y el posible papel jugado en ella por la interacción EphA2-EFNA4 con la que había explicado otros fenómenos que implican células endoteliales y células leucémicas. Este tipo celular endotelial es clásicamente aceptado en numerosas aproximaciones experimentales para estudiar el proceso de angiogénesis, las características de los endotelios vasculares o la diapédesis leucocitaria (*Butler y cols., 2010*). Uno de los principales problemas de trabajar con células endoteliales primarias *in vitro* reside, precisamente, en la necesidad de suplementarlas continuamente con suero y cócteles de factores angiogénicos que mantengan su viabilidad y propiedades durante el período de cultivo. Consiguientemente, los resultados obtenidos en estas aproximaciones, si se estudian a largo plazo, implican un efecto de los factores exógenos difíciles de discriminar (*Butler y cols., 2010*). Por ello, generalmente se buscan aproximaciones con líneas celulares endoteliales mucho más tolerantes a las condiciones de cultivo, sin necesidad de factores de crecimiento exógenos y a bajas concentraciones de suero pero que, desgraciadamente, como hemos comentado anteriormente, no parecen reproducen fielmente el comportamiento de las células endoteliales (*Butler y cols., 2010*). De hecho, algunos autores han descrito que las líneas endoteliales comúnmente utilizadas, incluyendo EA.hy926, difieren sensiblemente unas de otras y, especialmente, de las endoteliales primarias en numerosos aspectos tan importantes como las citocinas que producen o su respuesta a tratamientos inflamatorios como los inducidos con TNF- α ó IL-1 β (*Lidington y cols., 1999*).

El papel de las células endoteliales en cáncer ha sido clásicamente más relacionado con su vascularización (neoangiogénesis) para el suministro de nutrientes provenientes de sangre a los mismos, pero también a través de un papel más directo como la liberación de factores de crecimiento (VEGF, EFGF, citocinas) e interacciones célula-célula que implica a

moléculas como ICAM-1, VCAM-1, E-selectina e hialuronano (Butler y cols., 2010). Sin embargo, su capacidad de regular la homeostasis tisular también podría implicar en determinadas situaciones fenómenos de control de la supervivencia/apoptosis celular. De hecho, la expresión constitutiva de Fas-L en HEV y otros vasos sanguíneos de ganglios linfáticos (un hecho interesante de evaluar en el futuro en nuestro modelo) ha sido relacionada con su capacidad de inducir apoptosis como una forma selectiva de la entrada de linfocitos a los tejidos (Sata y Walsh, 1998; Kokkonen y cols., 2004). Por tanto, parece evidente que la función barrera del endotelio no sólo está relacionada con su papel en la regulación del tráfico leucocitario entre sangre y tejidos a través de fenómenos de adhesión, sino también de su capacidad para eliminar determinadas células cuando estas contactan con él (Walsh y Sata, 1999).

Nuestros resultados preliminares ponen de manifiesto que la interacción EphA2-EFNA4 a través de su comunicación con ICAM-1 y VCAM-1 modulan la muerte *in vitro* mediada por endotelios sobre las células B, principalmente B-LLC. Hemos tratado de determinar el papel de cada una de estas interacciones en el propio co-cultivo puesto que pensamos que sus efectos están, de alguna manera, relacionados y, presumiblemente, implican otras moléculas tanto del lado endotelial como del de la célula B o LLC, como de hecho pusieron de manifiesto experimentos con HUVEC vivas frente a fijadas o los distintos efectos de la adición de EphA2-Fc, EFNA4-Fc, rh-ICAM-1 o rh-VCAM-1 o sus combinaciones. De hecho, pensamos que este proceso podría estar relacionado con la propia TEM, como ya han apuntado otros autores (Sata y Walsh, 1998; Kokkonen y cols., 2004). En relación con ello, los efectos más significativos en los co-cultivos se alcanzaron en la condición en que las HUVEC habían sido pre-tratadas con TNF- α , una estimulación clásica para condicionarlas a TEM y que resulta en una alta expresión de ICAM-1 y VCAM-1 imprescindibles para que la migración tenga lugar (Dunon y cols., 1996; Aurrand-Lions y cols., 2002; Imhof y Aurrand-Lions, 2004; Luster y cols., 2005; Muller, 2009; Wittchen, 2009). Por tanto, en un proceso de TEM “autorizado”, como el guiado por quimiocinas, las células que migran recibirían señales de rescate como, por ejemplo, a través de la presentación de esas quimiocinas en la superficie de las células endoteliales y que contribuyen a la adhesión firme (Muller, 2009; Wittchen, 2009) y que, en otros sistemas, también tienen una función en la supervivencia como CXCL12 (Burger y cols., 2005). En este sentido, sería importante evaluar la supervivencia de las células en los co-cultivos discriminando, como habíamos hecho en los

experimentos de TEM, entre células migradas y aquéllas que permanecen en la superficie de la monocapa y tanto en ausencia como en presencia de gradientes de quimiocinas como CXCL12, CXCL13 ó CCL19, por su importancia en linfocitos B y su relación con la LLC (*Burger y cols., 1999; Till y cols., 2002; Lopez-Giral y cols., 2004; Trentin y cols., 2004*).

Basándonos en la propiedad de las células B-LLC de presentar un mecanismo de repulsión innato frente al contacto con los endotelios basado en la sobreexpresión de EFNA4 (*Trinidad y cols., 2009*), junto con su baja expresión de integrinas $\alpha\text{L}\beta 2$ (CD49d/CD29) y $\alpha 4\beta 1$ (CD11a/D18) (*Hartmann y cols., 2009*), todo parece indicar que estas células han desarrollado mecanismos moleculares que las mantienen separadas de los endotelios y sólo en determinadas circunstancias modulan la expresión/actividad de estas moléculas, se vuelven más adhesivas y migran mejor (*Trinidad y cols., 2009*). Considerando un papel pro-apoptótico de los endotelios, cabría esperar una alta tasa de apoptosis en sangre periférica de las B-LLC, algo que no es así (observaciones no mostradas). Presumiblemente, los mecanismos comentados podrían explicar, al menos parcialmente, este hecho, dado que las B-LLC repelen vía la sobre-expresión de EFNA4 esos contactos y, por tanto, “no se dejan matar”.

De ser así, cabe preguntarse por qué las B-LLC, aparentemente, no escapan mejor de apoptosis en los co-cultivos frente a las B sanas. Una posibilidad podría hallarse en las propias condiciones experimentales que no mimetizan la condición *in vivo*. Concretamente, una diferencia importante, entre otras, entre el sistema *in vitro* empleado y la condición *in vivo* radica en que en el primero las B-LLC permanecen continuamente en contacto con el endotelio y durante 12 horas, mientras que las B-LLC en el torrente circulatorio son arrastradas por el flujo sanguíneo contribuyendo a contactos más breves, arrastre y escape. Este factor es fundamental en la comprensión de las interacciones linfocito-endotelio como ha sido indicado por otros autores (*Alon y cols., 1996; Salmi y Jalkanen, 2005*). Sería importante, por tanto, trabajar en condiciones de flujo y analizar la apoptosis de las células arrastradas a fin de comprobar esta hipótesis. Otra posibilidad, podría radicar en diferencias en las moléculas expresadas por los endotelios *in vitro* e *in vivo*.

Es posible que los mecanismos de escape a apoptosis mediada por endotelios en las B-LLC no sean del todo operativos en el sistema *in vitro* debido a ese contacto continuo. Sin

embargo, las aproximaciones realizadas con EphA2-Fc y EFNA4-Fc sí pusieron de manifiesto un papel de esta interacción en las B-LLC que no fue posible reproducir con B sanas. Concretamente, el tratamiento con EphA2-Fc de las B-LLC resultó en una mayor supervivencia mientras que en B sanas ésta disminuyó ligeramente, un efecto sólo observado con HUVEC fijadas, lo cual estaría de acuerdo con los mecanismos de repulsión mediados por la señalización *reverse* en B-LLC como consecuencia de la sobre-expresión de EFNA4, no presente en las B sanas, como habían puesto de manifiesto nuestros experimentos de adhesión.

Otra evidencia a favor de que los mecanismos de repulsión son operativos en las B-LLC aunque no evidentes en el co-cultivo control, sin tratamientos, fue el hecho de encontrar un papel crítico de las principales moléculas de adhesión, ICAM-1 y VCAM-1, en las B-LLC pero no en B sanas, tras la adición de estas moléculas a los co-cultivos, poniendo de manifiesto su papel en el proceso de forma característica en las B-LLC. Aunque sus principales ligandos en la LLC, las integrinas LFA-1 y VLA-4, respectivamente, mayoritariamente han sido relacionadas, directa o indirectamente, con fenómenos que incrementan la supervivencia de las células del sistema inmune (*Paessens y cols., 2008; Unsinger y cols., 2010*), también se ha encontrado asociación entre ellas y apoptosis, concretamente entre LFA-1 y Fas en linfoma de Burkitt y en la línea leucémica Jurkat (*Krzyzowska y cols., 2001*) y, de forma más directa, a través de adhesión a FN vía integrinas en líneas celulares mieloides (*Sugahara y cols., 1994; Terui y cols., 1996*) y célula progenitoras eritroides (*Kapur y cols., 2001*), apoyando un posible papel apoptótico de integrinas en procesos leucémicos. Las células B sanas no reflejaron cambios significativos en su supervivencia a consecuencia de estos tratamientos, reforzando esta última teoría, pudiendo ser esta asociación, integrinas-apoptosis, consecuencia de la desregulación de las integrinas encontradas en B-LLC, la cual ha sido contemplada por otros autores (*Jewell y Yong, 1997; Hartmann y cols., 2009*). En este sentido, cabría preguntarse si la diferente función de supervivencia entre HUVEC y EA.hy926 en relación a las células B podría radicar, o al menos parcialmente, en las moléculas de adhesión que expresan unas y otras puesto que, como hemos comentado anteriormente, en general las líneas celulares endoteliales difieren sensiblemente de las primarias en su expresión de distintas moléculas, incluidas integrinas (*Lidington y cols., 1999*).

Finalmente, la relación entre las interacciones ICAM-1, VCAM-1 y EphA2-EFNA4 fueron puestas de manifiesto en los tratamientos combinados. En este caso, la respuesta de las células B sanas se asemejó a la de las B-LLC confirmando que la anulación combinada de la señalización EphA2/EFNA4 y la de ICAM-1 ó VCAM-1 con sus respectivos ligandos puede modular su respuesta en el mismo sentido que las B-LLC en lo que al efecto sobre su supervivencia se refiere. Un resultado sorprendente fue el encontrar que el tratamiento combinando ICAM-1–EphA2-Fc ó VCAM-1–EphA2-Fc resultaba en respuestas opuestas en términos de supervivencia en los cultivos. Nuestra interpretación a estos resultados preliminares se basa en la comunicación entre las señales ICAM-1 y VCAM-1 en las células endoteliales y en las B-LLC a través de los ligandos respectivos, integrinas $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ (LFA-1) y $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ (VLA-4). En ausencia de tratamiento EphA2-Fc, la señalización a través de EphA2-EFNA4 continúa y la adición de formas solubles de rh-ICAM-1 ó rh-VCAM-1 conduce al apagamiento de sólo una de estas dos señales, mientras que se mantiene la otra interacción entre célula B y endotelio. Sin embargo, en el tratamiento combinando de rh-ICAM-1 ó rh-VCAM-1 con EphA2-Fc sólo se mantiene la comunicación a través de una de las moléculas de adhesión probablemente manifestando su verdadero papel en la supervivencia. Así, el tratamiento combinando de EphA2-Fc e rh-ICAM-1 dejaría a la señalización VCAM-1 actuar sola, manifestándose esta señalización en un descenso de la muerte en los cultivos. Por el contrario, el tratamiento combinado de EphA2-Fc y rh-VCAM-1, pone al descubierto el papel de ICAM-1 relacionándolo con muerte. No obstante, serían necesarias nuevas aproximaciones para determinar si el papel de ICAM-1 y VCAM-1 en la apoptosis mediada por endotelios sobre las células B es directo y/o a través de otros mediadores como podría ser Fas-L. En este sentido, las integrinas expresadas por las células B-LLC pueden mediar procesos de supervivencia dependiendo de las condiciones inductoras de apoptosis. Por ejemplo, en LLC, se encontró que la integrina $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ (VLA-4) podía rescatar de apoptosis células B-LLC cultivadas sobre fibronectina y en condiciones pro-apoptóticas de bajo contenido de suero en el medio de cultivo, mientras que no lo hacía frente a otras señales pro-apoptóticas como las mediadas por Fas (*García-Gila y cols., 2002*).

Perspectivas futuras

En base a los resultados obtenidos y como hemos tratado de poner de manifiesto a lo largo de la presentación de este estudio, son muchos los interrogantes que han surgido tanto en relación con la expresión y posible función de Eph/EFN en células B-LLC y en células B como de la LLC en sí misma y la posibilidad de su extrapolación a la normal fisiología del linfocito B. Hemos profundizado en algunos de ellos pero, evidentemente, otros muchos han quedado inexplorados o estamos haciéndolo actualmente, como hemos tratado de reflejar puntualmente en resultados y/o discusión. Concretamente, queremos remarcar algunos aspectos por su importancia:

1.- Pensamos que Eph/EFN podrían ser biomarcadores en otros SLPC pendientes de explorar.

2.- Actualmente, estamos ampliando nuestro estudio de expresión de Eph/EFN en LLC, estableciendo estudios conjuntos con hospitales de otras localizaciones geográficas (ampliando la población muestral) y bajo la supervisión y consejo de especialistas clínicos expertos en esta patología, como los que han participado, directa o indirectamente, en el presente estudio, con el fin de confirmar su potencialidad como biomarcadores y/o dianas terapéuticas, tanto para los miembros destacados como para otros que no ha sido posible relacionar de forma significativa con la enfermedad como EphA4, EphA8, EphA10, EphA1 ó EFNA1, pero cuya expresión diferencial en LLC queremos clarificar. Concretamente: a.- considerando la expresión de formas de *splicing* alternativo para todos los miembros en los que éstas son actualmente conocidas; b.- reevaluando la expresión en nuevas muestras de los pacientes incluidos en el estudio de expresión, con el fin de relacionarla con su evolución clínica y la posible aparición de cambios moleculares relevantes (alteraciones citogenéticas, expresión de ZAP-70, segmentos V-D-J de Ig y mutaciones somáticas) así como en relación con otros indicadores clínicos que no han podido ser del todo evaluados como LDH, TK y β 2M, como indicadores de actividad tumoral o , por su valor predictivo, en relación con la respuesta a tratamiento; c.- nuevos análisis de expresión en grupos de pacientes seleccionados acorde a características citogenéticas de alto riesgo como del17p o del11q frente a pacientes eusómicos, y respuesta a tratamiento, comparando células B-LLC del mismo paciente extraídas de distintas localizaciones tisulares (sangre periférica y, hasta donde sea posible, médula ósea y/o linfadenopatías).

3.- No descartamos que, como mostraban los estudios de inmunofluorescencia en las linfadenopatías, otros tipos celulares como linfocitos T o células estromales puedan interactuar con las células leucémicas a través de Eph/EFN, como EphA4 en los primeros o EphA3 en las segundas, y su posible papel en los pseudofolículos, sobre lo cual ya tenemos resultados preliminares (*Trinidad et al.*, DIFHEMAT, Madrid, CNIO, 2009; artículo en preparación).

4.- Actualmente, estamos analizando *in vivo*, en modelos xenogénicos con ratones NOD-SCID-IL2Rg^{-/-} inoculados con células B-LLC humanas, si el bloqueo/señalización a través de EFNA4 modula los patrones de migración a médula ósea, ganglios y bazo, por su posible utilidad terapéutica.

Conclusiones

En relación con los objetivos planteados, nuestros resultados sugieren las siguientes conclusiones:

1.- El patrón de expresión de Eph/EFN en B-LLC de sangre periférica está más relacionada con la de linfocitos B sanos activados *in vitro* o con la de los linfocitos B aislados de ganglios linfáticos, confirmando que las B-LLC presentan un fenotipo activado.

2.- La expresión de determinadas Eph/EFN en LLC, podría ser utilizada como marcador de pronóstico de la enfermedad; concretamente:

2.1.- Neoexpresión de EphB6 (ARNm y proteína) en B-LLC: se asocia con mal pronóstico.

2.2.- Sobre-expresión de EFNA4 en células B-LLC en comparación a linfocitos B sanos, es menor en pacientes en estadios avanzados (riesgo intermedio y alto) principalmente en aquéllos que presentan linfadenopatías.

2.3.- Expresión de EphA1 y su ligando, EFNA1, se asocian con una condición clínica favorable: menor contenido en ARNm de ZAP-70 y baja linfocitosis para el receptor y ausencia de linfadenopatía y estadio de riesgo bajo, para el ligando.

2.4.- Otras moléculas expresadas diferencialmente en LLC como EphA4, EphA8 ó EphA10, que no han sido estudiadas en profundidad en nuestro trabajo, podrían considerarse también en un futuro como marcadores de pronóstico de la enfermedad.

2.5.- Células B-LLC procedentes de linfadenopatías muestran un patrón específico de Eph/EFN, ausencia de EphA3, EphA5, EFNA1 ó EphB1 y presencia de EphA8, EphB2, EphB3 y EphB4, no encontrado en células B aisladas de ganglios control.

3.- La señalización *reverse* en linfocitos B determina un proceso autónomo de repulsión celular, que en células leucémicas B-LLC, con sobre-expresión de EFNA4, se traduce en acumulación de estas células en la sangre periférica de los pacientes.

4.- Este proceso de repulsión está mediado por una menor adhesión a los endotelios probablemente mediada por integrinas como $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ (CD11a/CD18) ó $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ (CD49d/CD29) y CD44, así como por una regulación negativa de la quimiotaxis mediada por CCR7. En contacto con endotelios, EFNA4 también modula negativamente de forma no autónoma la trans migración dirigida por CXCL12 ó CXCL13.

5.- Resultados preliminares sugirieron, aunque necesitan confirmación que este mismo mecanismo de repulsión entre células B-LLC y endotelios podría proporcionar una forma de escape de la muerte a las células leucémicas circulantes.

6.- Nuestros resultados sugieren un papel para las interacciones EphA2-EFNA4 en la diapédesis o migración transendotelial de las células B leucémicas, que también podrían estar implicadas en la migración de linfocitos B sanos a través de HEV en los ganglios linfáticos.

7.- El contacto entre células endoteliales primarias, HUVEC, y células B, tanto sanas como leucémicas, reduce la supervivencia linfoide, mientras que con líneas celulares endoteliales, EA.hy926, la promueve.

8.- La supervivencia de las células B, tanto sanas como leucémicas, es mayor en presencia de células endoteliales vivas, tanto HUVEC como EA.hy926, sugiriendo un papel en la supervivencia de factores solubles liberados por las endoteliales y/o de moléculas implicadas en la comunicación célula a célula.

9.- Así, la aparente capacidad pro-apoptótica del endotelio primario (HUVEC) está mediada por la interacción EphA2-EFNA4 que modula las interacciones ICAM-1/LFA-1 y VCAM-1/VLA-4, aunque sin duda otras moléculas deben estar implicadas en el proceso.

Bibliografía

- Aasheim, H.C., Munthe, E., Funderud, S., Smeland, E.B., Beiske, K. y Logtenberg, T. (2000). A splice variant of human ephrin-A4 encodes a soluble molecule that is secreted by activated human B lymphocytes. *Blood* **95**, 221-30.
- Aasheim, H.C., Patzke, S., Hjorthaug, H.S. y Finne, E.F. (2005). Characterization of a novel Eph receptor tyrosine kinase, EphA10, expressed in testis. *Biochim Biophys Acta* **1723**, 1-7.
- Aasheim, H.C., Terstappen, L.W. y Logtenberg, T. (1997). Regulated expression of the Eph-related receptor tyrosine kinase Hek11 in early human B lymphopoiesis. *Blood* **90**, 3613-22.
- Alfaro, D., Garcia-Ceca, J.J., Cejalvo, T., Jimenez, E., Jenkinson, E.J., Anderson, G., Munoz, J.J. y Zapata, A. (2007). EphrinB1-EphB signaling regulates thymocyte-epithelium interactions involved in functional T cell development. *Eur J Immunol* **37**, 2596-605.
- Almeida, J., Nieto, W.G., Teodosio, C., Pedreira, C.E., Lopez, A., Fernandez-Navarro, P., Nieto, A., Rodriguez-Caballero, A., Munoz-Criado, S., Jara-Acevedo, M. y cols. (2011). CLL-like B-lymphocytes are systematically present at very low numbers in peripheral blood of healthy adults. *Leukemia* **25**, 718-22.
- Alon, R., Fuhbrigge, R.C., Finger, E.B. y Springer, T.A. (1996). Interactions through L-selectin between leukocytes and adherent leukocytes nucleate rolling adhesions on selectins and VCAM-1 in shear flow. *J Cell Biol* **135**, 849-65.
- Alon, R. y Luscinskas, F.W. (2004). Crawling and INTEGRating apical cues. *Nat Immunol* **5**, 351-3.
- Aionso, C.L., Trinidad, E.M., de Garcilian, B., Baliesteros, M., Castellanos, M., Cotillo, I., Munoz, J.J. y Zapata, A.G. (2009). Expression profile of Eph receptors and ephrin ligands in healthy human B lymphocytes and chronic lymphocytic leukemia B-cells. *Leuk Res* **33**, 395-406.
- Arvanitis, D. y Davy, A. (2008). Eph/ephrin signaling: networks. *Genes Dev* **22**, 416-29.
- Aurrand-Lions, M., Johnson-Leger, C. y Imhof, B.A. (2002a). The last molecular fortress in leukocyte trans-endothelial migration. *Nat Immunol* **3**, 116-8.
- Aurrand-Lions, M., Johnson-Leger, C. y Imhof, B.A. (2002b). Role of interendothelial adhesion molecules in the control of vascular functions. *Vascul Pharmacol* **39**, 239-46.
- Autiero, M., De Smet, F., Claes, F. y Carmeliet, P. (2005). Role of neural guidance signals in blood vessel navigation. *Cardiovasc Res* **65**, 629-38.
- Bajenoff, M., Egen, J.G., Qi, H., Huang, A.Y., Castellino, F. y Germain, R.N. (2007). Highways, byways and breadcrumbs: directing lymphocyte traffic in the lymph node. *Trends Immunol* **28**, 346-52.
- Bannerji, R. y Byrd, J.C. (2000). Update on the biology of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Oncol* **12**, 22-9.
- Baranska, P., Jerczynska, H., Pawlowska, Z., Koziolkiewicz, W. y Cierniewski, C. (2005). Expression of Integrins and Adhesive Properties of Human Endothelial Cell Line EA.hy 926. *CANCER GENOMICS & PROTEOMICS* **2**, 265-270.
- Battle, E., Bacani, J., Begthel, H., Jonkheer, S., Gregorieff, A., van de Born, M., Malats, N., Sancho, E., Boon, E., Pawson, T. y cols. (2005). EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression. *Nature* **435**, 1126-30.
- Bazerbashi, M.B., Reeve, J. y Chanarin, I. (1978). Studies in chronic lymphocytic leukaemia. The kinetics of 51Cr-labelled lymphocytes. *Scand J Haematol* **20**, 37-51.

Beckmann, M.P., Cerretti, D.P., Baum, P., Vanden Bos, T., James, L., Farrah, T., Kozlosky, C., Hollingsworth, T., Shilling, H., Maraskovsky, E. y cols. (1994). Molecular characterization of a family of ligands for eph-related tyrosine kinase receptors. *EMBO J* **13**, 3757-62.

Bertilaccio, M.T., Scielzo, C., Muzio, M. y Caligaris-Cappio, F. (2010). An overview of chronic lymphocytic leukaemia biology. *Best Pract Res Clin Haematol* **23**, 21-32.

Binder, M., Lechenne, B., Ummanni, R., Scharf, C., Balabanov, S., Trusch, M., Schluter, H., Braren, I., Spillner, E. y Trepel, M. (2010). Stereotypical chronic lymphocytic leukemia B-cell receptors recognize survival promoting antigens on stromal cells. *PLoS ONE* **5**, e15992.

Binet, J.L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguët, H., Goasguen, J., Vaugier, G., Potron, G., Colona, P., Oberling, F. y cols. (1981). A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* **48**, 198-206.

Binns, K.L., Taylor, P.P., Sicheri, F., Pawson, T. y Holland, S.J. (2000). Phosphorylation of tyrosine residues in the kinase domain and juxtamembrane region regulates the biological and catalytic activities of Eph receptors. *Mol Cell Biol* **20**, 4791-805.

Boyd, A.W., Ward, L.D., Wicks, I.P., Simpson, R.J., Salvaris, E., Wilks, A., Welch, K., Loudovaris, M., Rockman, S. y Busmanis, I. (1992). Isolation and characterization of a novel receptor-type protein tyrosine kinase (hek) from a human pre-B cell line. *J Biol Chem* **267**, 3262-7.

Brantley-Sieders, D., Schmidt, S., Parker, M. y Chen, J. (2004). Eph receptor tyrosine kinases in tumor and tumor microenvironment. *Curr Pharm Des* **10**, 3431-42.

Brantley-Sieders, D.M. y Chen, J. (2004). Eph receptor tyrosine kinases in angiogenesis: from development to disease. *Angiogenesis* **7**, 17-28.

Brantley-Sieders, D.M., Zhuang, G., Hicks, D., Fang, W.B., Hwang, Y., Cates, J.M., Coffman, K., Jackson, D., Bruckheimer, E., Muraoka-Cook, R.S. y cols. (2008). The receptor tyrosine kinase EphA2 promotes mammary adenocarcinoma tumorigenesis and metastatic progression in mice by amplifying ErbB2 signaling. *J Clin Invest* **118**, 64-78.

Bruckner, K., Pablo Labrador, J., Scheiffele, P., Herb, A., Seeburg, P.H. y Klein, R. (1999). EphrinB ligands recruit GRIP family PDZ adaptor proteins into raft membrane microdomains. *Neuron* **22**, 511-24.

Buggins, A.G., Pepper, C., Patten, P.E., Hewamana, S., Gohil, S., Moorhead, J., Folarin, N., Yallop, D., Thomas, N.S., Mufti, G.J. y cols. (2010). Interaction with vascular endothelium enhances survival in primary chronic lymphocytic leukemia cells via NF-kappaB activation and de novo gene transcription. *Cancer Res* **70**, 7523-33.

Buhler, A., Zenz, T. y Stilgenbauer, S. (2010). Immunoglobulin heavy chain variable gene usage and (super)-antigen drive in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* **16**, 373-5.

Burger, J.A., Burger, M. y Kipps, T.J. (1999). Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood* **94**, 3658-67.

Burger, J.A. y Kipps, T.J. (2002). Chemokine receptors and stromal cells in the homing and homeostasis of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leuk Lymphoma* **43**, 461-6.

Burger, J.A., Tsukada, N., Burger, M., Zvaifler, N.J., Dell'Aquila, M. y Kipps, T.J. (2000). Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* **96**, 2655-63.

- Burger, M., Hartmann, T., Krome, M., Rawluk, J., Tamamura, H., Fujii, N., Kipps, T.J. y Burger, J.A. (2005). Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor (CD184) antagonize the activation, migration, and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* **106**, 1824-30.
- Burkle, A., Niedermeier, M., Schmitt-Graff, A., Wierda, W.G., Keating, M.J. y Burger, J.A. (2007). Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **110**, 3316-25.
- Butler, J.M., Kobayashi, H. y Rafii, S. (2010). Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors. *Nat Rev Cancer* **10**, 138-46.
- Caligaris-Cappio, F. (2000). Biology of chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* **4**, 5-21.
- Campbell, J.J., Hedrick, J., Zlotnik, A., Siani, M.A., Thompson, D.A. y Butcher, E.C. (1998). Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* **279**, 381-4.
- Campbell, T.N., Attwell, S., Arcellana-Panlilio, M. y Robbins, S.M. (2006). Ephrin A5 expression promotes invasion and transformation of murine fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **350**, 623-8.
- Campbell, T.N., Davy, A., Liu, Y., Arcellana-Panlillo, M. y Robbins, S.M. (2008). Distinct membrane compartmentalization and signaling of ephrin-A5 and ephrin-B1. *Biochem Biophys Res Commun* **375**, 362-6.
- Carman, C.V., Sage, P.T., Sciuto, T.E., de la Fuente, M.A., Geha, R.S., Ochs, H.D., Dvorak, H.F., Dvorak, A.M. y Springer, T.A. (2007). Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity* **26**, 784-97.
- Castano, J., Davalos, V., Schwartz, S., Jr. y Arango, D. (2008). EPH receptors in cancer. *Histol Histopathol* **23**, 1011-23.
- Cinamon, G., Shinder, V., Shamri, R. y Alon, R. (2004). Chemoattractant signals and beta 2 integrin occupancy at apical endothelial contacts combine with shear stress signals to promote transendothelial neutrophil migration. *J Immunol* **173**, 7282-91.
- Collins, R.J., Verschuer, L.A., Harmon, B.V., Prentice, R.L., Pope, J.H. y Kerr, J.F. (1989). Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br J Haematol* **71**, 343-50.
- Corcoran, M., Parker, A., Orchard, J., Davis, Z., Wirtz, M., Schmitz, O.J. y Oscier, D. (2005). ZAP-70 methylation status is associated with ZAP-70 expression status in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* **90**, 1078-88.
- Cowan, C.A. y Henkemeyer, M. (2001). The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals. *Nature* **413**, 174-9.
- Cowan, C.A. y Henkemeyer, M. (2002). Ephrins in reverse, park and drive. *Trends Cell Biol* **12**, 339-46.
- Crespo, M., Bosch, F., Villamor, N., Bellosillo, B., Colomer, D., Rozman, M., Marce, S., Lopez-Guillermo, A., Campo, E. y Montserrat, E. (2003). ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **348**, 1764-75.
- Criel, A., Michaux, L. y De Wolf-Peeters, C. (1999). The concept of typical and atypical chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma* **33**, 33-45.
- Chan, B. y Sukhatme, V.P. (2009). Receptor tyrosine kinase EphA2 mediates thrombin-induced upregulation of ICAM-1 in endothelial cells in vitro. *Thromb Res* **123**, 745-52.

Chen, J., Zhuang, G., Frieden, L. y Debsinski, W. (2008). Eph receptors and Ephrins in cancer: common themes and controversies. *Cancer Res* **68**, 10031-3.

Chen, J.R., Gu, B.J., Dao, L.P., Bradley, C.J., Mulligan, S.P. y Wiley, J.S. (1999). Transendothelial migration of lymphocytes in chronic lymphocytic leukaemia is impaired and involved down-regulation of both L-selectin and CD23. *Br J Haematol* **105**, 181-9.

Chiorazzi, N., Hatzi, K. y Albesiano, E. (2005). B-cell chronic lymphocytic leukemia, a clonal disease of B lymphocytes with receptors that vary in specificity for (auto)antigens. *Ann N Y Acad Sci* **1062**, 1-12.

Chong, L.D., Park, E.K., Latimer, E., Friesel, R. y Daar, I.O. (2000). Fibroblast growth factor receptor-mediated rescue of x-ephrin B1-induced cell dissociation in *Xenopus* embryos. *Mol Cell Biol* **20**, 724-34.

D'Arena, G., Di Renzo, N., Brugiattelli, M., Viglioni, M.L. y Keating, M.J. (2003). Biological and clinical heterogeneity of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* **44**, 223-8.

Dameshek, W. (1967). Chronic lymphocytic leukemia--an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood* **29**, Suppl:566-84.

Damle, R.N., Batliwalla, F.M., Ghiotto, F., Valetto, A., Albesiano, E., Sison, C., Allen, S.L., Kolitz, J., Vinciguerra, V.P., Kudalkar, P. y cols. (2004). Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. *Blood* **103**, 375-82.

Damle, R.N., Ghiotto, F., Valetto, A., Albesiano, E., Fais, F., Yan, X.J., Sison, C.P., Ailen, S.L., Kolitz, J., Schulman, P. y cols. (2002). B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood* **99**, 4087-93.

Damle, R.N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S.L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J. y cols. (1999). Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **94**, 1840-7.

Davy, A., Bush, J.O. y Soriano, P. (2006). Inhibition of gap junction communication at ectopic Eph/ephrin boundaries underlies craniofrontonasal syndrome. *PLoS Biol* **4**, e315.

Davy, A., Gale, N.W., Murray, E.W., Klinghoffer, R.A., Soriano, P., Feuerstein, C. y Robbins, S.M. (1999). Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion. *Genes Dev* **13**, 3125-35.

Davy, A. y Robbins, S.M. (2000). Ephrin-A5 modulates cell adhesion and morphology in an integrin-dependent manner. *EMBO J* **19**, 5396-405.

Davy, A. y Soriano, P. (2005). Ephrin signaling in vivo: look both ways. *Dev Dyn* **232**, 1-10.

De Bruyn, P.P., Cho, Y. y Micheison, S. (1989). Endothelial attachment and plasmalemmal apposition in the transcellular movement of intravascular leukemic cells entering the myeloid parenchyma. *Am J Anat* **186**, 115-26.

de la Fuente, M.T., Casanova, B., Garcia-Gila, M., Silva, A. y Garcia-Pardo, A. (1999). Fibronectin interaction with alpha4beta1 integrin prevents apoptosis in B cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with Bcl-2 and Bax. *Leukemia* **13**, 266-74.

de la Fuente, M.T., Casanova, B., Moyano, J.V., Garcia-Gila, M., Sanz, L., Garcia-Marco, J., Silva, A. y Garcia-Pardo, A. (2002). Engagement of alpha4beta1 integrin by fibronectin induces in vitro resistance of B chronic lymphocytic leukemia cells to fludarabine. *J Leukoc Biol* **71**, 495-502.

- De Rossi, G., Marroni, P., Paganuzzi, M., Mauro, F.R., Tenca, C., Zarccone, D., Velardi, A., Molica, S. y Grossi, C.E. (1997). Increased serum levels of soluble CD44 standard, but not of variant isoforms v5 and v6, in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **11**, 134-41.
- De Rossi, G., Mauro, F.R., Caruso, R., Monarca, B. y Mandelli, F. (1993). Fludarabine and prednisone in pretreated and refractory B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) in advanced stages. *Haematologica* **78**, 167-71.
- Deans, J.P. y Polyak, M.J. (2008). FMC7 is an epitope of CD20. *Blood* **111**, 2492; author reply 2493-4.
- Dick, F.R. y Maca, R.D. (1978). The lymph node in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* **41**, 283-92.
- Dighiero, G., Travade, P., Chevrete, S., Fenaux, P., Chastang, C. y Binet, J.L. (1991). B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. French Cooperative Group on CLL. *Blood* **78**, 1901-14.
- Dohner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Krober, A., Bullinger, L., Dohner, K., Bentz, M. y Lichter, P. (2000). Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **343**, 1910-6.
- Dormer, P., Theml, H. y Lau, B. (1983). Chronic lymphocytic leukemia: a proliferative or accumulative disorder? *Leuk Res* **7**, 1-10.
- Dravis, C., Yokoyama, N., Chumley, M.J., Cowan, C.A., Siivany, R.E., Shay, J., Baker, L.A. y Henkemeyer, M. (2004). Bidirectional signaling mediated by ephrin-B2 and EphB2 controls urorectal development. *Dev Biol* **271**, 272-90.
- Dunon, D., Piali, L. y Imhof, B.A. (1996). To stick or not to stick: the new leukocyte homing paradigm. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 714-23.
- Edgell, C.J., McDonald, C.C. y Graham, J.B. (1983). Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 3734-7.
- Eisterer, W., Bechter, O., Soderberg, O., Nilsson, K., Terol, M., Greil, R., Thaler, J., Herold, M., Finke, L., Gunthert, U. y cols. (2004). Elevated levels of soluble CD44 are associated with advanced disease and in vitro proliferation of neoplastic lymphocytes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Res* **28**, 1043-51.
- Fais, F., Ghiotto, F., Hashimoto, S., Sellars, B., Valetto, A., Allen, S.L., Schulman, P., Vinciguerra, V.P., Rai, K., Rassenti, L.Z. y cols. (1998). Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest* **102**, 1515-25.
- Fangazio, M., De Paoli, L., Rossi, D. y Gaidano, G. (2011). Predictive markers and driving factors behind Richter syndrome development. *Expert Rev Anticancer Ther* **11**, 433-42.
- Feldheim, D.A. y O'Leary, D.D. (2010). Visual map development: bidirectional signaling, bifunctional guidance molecules, and competition. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a001768.
- Flanagan, J.G. y Vanderhaeghen, P. (1998). The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci* **21**, 309-45.
- Freywald, A., Sharfe, N., Miller, C.D., Rashotte, C. y Roifman, C.M. (2006). EphA receptors inhibit anti-CD3-induced apoptosis in thymocytes. *J Immunol* **176**, 4066-74.
- Freywald, A., Sharfe, N., Rashotte, C., Grunberger, T. y Roifman, C.M. (2003). The EphB6 receptor inhibits JNK activation in T lymphocytes and modulates T cell receptor-mediated responses. *J Biol Chem* **278**, 10150-6.

- Freywald, A., Sharfe, N. y Roifman, C.M.** (2002). The kinase-null EphB6 receptor undergoes transphosphorylation in a complex with EphB1. *J Biol Chem* **277**, 3823-8.
- Friedman, G.C. y O'Leary, D.D.** (1996). Eph receptor tyrosine kinases and their ligands in neural development. *Curr Opin Neurobiol* **6**, 127-33.
- Fu, X., McGrath, S., Pasillas, M., Nakazawa, S. y Kamps, M.P.** (1999). EB-1, a tyrosine kinase signal transduction gene, is transcriptionally activated in the t(1;19) subset of pre-B ALL, which express oncoprotein E2a-Pbx1. *Oncogene* **18**, 4920-9.
- Gallo, G. y Letourneau, P.C.** (2004). Regulation of growth cone actin filaments by guidance cues. *J Neurobiol* **58**, 92-102.
- Gallo, G., Yee, H.F., Jr. y Letourneau, P.C.** (2002). Actin turnover is required to prevent axon retraction driven by endogenous actomyosin contractility. *J Cell Biol* **158**, 1219-28.
- García-Ceca, J., Jimenez, E., Alfaro, D., Cejalvo, T., Muñoz, J.J. y Zapata, A.G.** (2009). Cell-autonomous role of EphB2 and EphB3 receptors in the thymic epithelial cell organization. *Eur J Immunol* **39**, 2916-24.
- García-Gila, M., López-Martin, E.M. y García-Pardo, A.** (2002). Adhesion to fibronectin via alpha4 integrin (CD49d) protects B cells from apoptosis induced by serum deprivation but not via IgM or Fas/Apo-1 receptors. *Clin Exp Immunol* **127**, 455-62.
- Gattei, V., Bulian, P., Del Principe, M.I., Zucchetto, A., Maurillo, L., Buccisano, F., Bomben, R., Dal-Bo, M., Luciano, F., Rossi, F.M. y cols.** (2008). Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **111**, 865-73.
- Germain, R.N., Bajenoff, M., Castellino, F., Chieppa, M., Egen, J.G., Huang, A.Y., Ishii, M., Koo, L.Y. y Qi, H.** (2008). Making friends in out-of-the-way places: how cells of the immune system get together and how they conduct their business as revealed by intravital imaging. *Immunol Rev* **221**, 163-81.
- Ghia, P. y Caligaris-Cappio, F.** (2000). The indispensable role of microenvironment in the natural history of low-grade B-cell neoplasms. *Adv Cancer Res* **79**, 157-73.
- Ghia, P. y Caligaris-Cappio, F.** (2006). The origin of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* **33**, 150-6.
- Ghia, P., Chiorazzi, N. y Stamatopoulos, K.** (2008). Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation. *J Intern Med* **264**, 549-62.
- Gu, B., Dao, L.P. y Wiley, J.** (2001). Impaired transendothelial migration of B-CLL lymphocytes: a defect linked to low L-selectin expression. *Leuk Lymphoma* **42**, 5-12.
- Hafner, C., Bataille, F., Meyer, S., Becker, B., Roesch, A., Landthaler, M. y Vogt, T.** (2003). Loss of EphB6 expression in metastatic melanoma. *Int J Oncol* **23**, 1553-9.
- Hallek, M., Langenmayer, I., Nerl, C., Knauf, W., Dietzfelbinger, H., Adorf, D., Ostwald, M., Busch, R., Kuhn-Hallek, I., Thiel, E. y cols.** (1999). Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **93**, 1732-7.
- Hamblin, T.** (2002). Chronic lymphocytic leukaemia: one disease or two? *Ann Hematol* **81**, 299-303.
- Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscler, D.G. y Stevenson, F.K.** (1999). Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **94**, 1848-54.
- Hansen, M.J., Dallal, G.E. y Flanagan, J.G.** (2004). Retinal axon response to ephrin-as shows a graded, concentration-dependent transition from growth promotion to inhibition. *Neuron* **42**, 717-30.

- Hartmann, T.N., Grabovsky, V., Wang, W., Desch, P., Rubenzer, G., Wollner, S., Binsky, I., Vallon-Eberhard, A., Sapoznikov, A., Burger, M. y cols. (2009). Circulating B-cell chronic lymphocytic leukemia cells display impaired migration to lymph nodes and bone marrow. *Cancer Res* **69**, 3121-30.
- Hattori, M., Osterfield, M. y Flanagan, J.G. (2000). Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science* **289**, 1360-5.
- Hellerstein, M.K. y Neese, R.A. (1999). Mass isotopomer distribution analysis at eight years: theoretical, analytic, and experimental considerations. *Am J Physiol* **276**, E1146-70.
- Heroult, M., Schaffner, F. y Augustin, H.G. (2006). Eph receptor and ephrin ligand-mediated interactions during angiogenesis and tumor progression. *Exp Cell Res* **312**, 642-50.
- Herve, M., Xu, K., Ng, Y.S., Wardemann, H., Albesiano, E., Messmer, B.T., Chiorazzi, N. y Meffre, E. (2005). Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *J Clin Invest* **115**, 1636-43.
- Hess, A.R., Seftor, E.A., Gruman, L.M., Kinch, M.S., Seftor, R.E. y Hendrix, M.J. (2006). VE-cadherin regulates EphA2 in aggressive melanoma cells through a novel signaling pathway: implications for vasculogenic mimicry. *Cancer Biol Ther* **5**, 228-33.
- Himanen, J.P. y Nikolov, D.B. (2003a). Eph receptors and ephrins. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 130-4.
- Himanen, J.P. y Nikolov, D.B. (2003b). Eph signaling: a structural view. *Trends Neurosci* **26**, 46-51.
- Himanen, J.P., Saha, N. y Nikolov, D.B. (2007). Cell-cell signaling via Eph receptors and ephrins. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 534-42.
- Hindges, R., McLaughlin, T., Genoud, N., Henkemeyer, M. y O'Leary, D.D. (2002). EphB forward signaling controls directional branch extension and arborization required for dorsal-ventral retinotopic mapping. *Neuron* **35**, 475-87.
- Hirai, H., Maru, Y., Hagiwara, K., Nishida, J. y Takaku, F. (1987). A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *Science* **238**, 1717-20.
- Hiratsuka, S. (2011). Vasculogenesis, angiogenesis and special features of tumor blood vessels. *Front Biosci* **16**, 1413-27.
- Hjorthaug, H.S. y Aasheim, H.C. (2007). Ephrin-A1 stimulates migration of CD8+CCR7+ T lymphocytes. *Eur J Immunol* **37**, 2326-36.
- Hock, B.D., McKenzie, J.L., Patton, N.W., Drayson, M., Taylor, K., Wakeman, C., Kantarjian, H., Giles, F. y Aibitar, M. (2006). Circulating levels and clinical significance of soluble CD40 in patients with hematologic malignancies. *Cancer* **106**, 2148-57.
- Holmberg, J., Clarke, D.L. y Frisen, J. (2000). Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor. *Nature* **408**, 203-6.
- Huai, J. y Drescher, U. (2001). An ephrin-A-dependent signaling pathway controls integrin function and is linked to the tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein. *J Biol Chem* **276**, 6689-94.
- Hultdin, M., Rosenquist, R., Thunberg, U., Tobin, G., Norrback, K.F., Johnson, A., Sundstrom, C. y Roos, G. (2003). Association between telomere length and V(H) gene mutation status in chronic lymphocytic leukaemia: clinical and biological implications. *Br J Cancer* **88**, 593-8.

Huttmann, A., Klein-Hitpass, L., Thomale, J., Deenen, R., Carpinteiro, A., Nuckel, H., Ebeiling, P., Fuhrer, A., Edelmann, J., Seilmann, L. y cols. (2006). Gene expression signatures separate B-cell chronic lymphocytic leukaemia prognostic subgroups defined by ZAP-70 and CD38 expression status. *Leukemia* **20**, 1774-82.

Huynh-Do, U., Stein, E., Lane, A.A., Liu, H., Cerretti, D.P. y Daniel, T.O. (1999). Surface densities of ephrin-B1 determine EphB1-coupled activation of cell attachment through alphavbeta3 and alpha5beta1 integrins. *EMBO J* **18**, 2165-73.

Ibrahim, S., Keating, M., Do, K.A., O'Brien, S., Huh, Y.O., Jilani, I., Lerner, S., Kantarjian, H.M. y Albitar, M. (2001). CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **98**, 181-6.

Imhof, B.A. y Aurrand-Lions, M. (2004). Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol* **4**, 432-44.

Inada, T., Iwama, A., Sakano, S., Ohno, M., Sawada, K. y Suda, T. (1997). Selective expression of the receptor tyrosine kinase, HTK, on human erythroid progenitor cells. *Blood* **89**, 2757-65.

Ireton, R.C. y Chen, J. (2005). EphA2 receptor tyrosine kinase as a promising target for cancer therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets* **5**, 149-57.

Irie, F., Okuno, M., Pasquale, E.B. y Yamaguchi, Y. (2005). EphrinB-EphB signalling regulates clathrin-mediated endocytosis through tyrosine phosphorylation of synaptojanin 1. *Nat Cell Biol* **7**, 501-9.

Ivanov, A.I. y Romanovsky, A.A. (2006). Putative dual role of ephrin-Eph receptor interactions in inflammation. *IUBMB Life* **58**, 389-94.

Jablonska, E., Kiersnowska-Rogowska, B., Rogowski, F., Parfienczyk, A., Puzewska, W. y Bukin, M. (2005). TNF family molecules in the serum of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Leuk Lymphoma* **46**, 1307-12.

Janes, P.W., Adikari, S. y Lackmann, M. (2008). Eph/ephrin signalling and function in oncogenesis: lessons from embryonic development. *Curr Cancer Drug Targets* **8**, 473-9.

Jewell, A.P. y Yong, K.L. (1997). Regulation and function of adhesion molecules in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Acta Haematol* **97**, 67-72.

Jiang, G., Freywald, T., Webster, J., Kozan, D., Geyer, R., DeCoteau, J., Narendran, A. y Freywald, A. (2008). In human leukemia cells ephrin-B-induced invasive activity is supported by Lck and is associated with reassembling of lipid raft signaling complexes. *Mol Cancer Res* **6**, 291-305.

Kalo, M.S. y Pasquale, E.B. (1999). Signal transfer by eph receptors. *Cell Tissue Res* **298**, 1-9.

Kalo, M.S., Yu, H.H. y Pasquale, E.B. (2001). In vivo tyrosine phosphorylation sites of activated ephrin-B1 and ephB2 from neural tissue. *J Biol Chem* **276**, 38940-8.

Kantarjian, H.M., Smith, T., Estey, E., Polyzos, A., O'Brien, S., Pierce, S., Beran, M., Feldman, E. y Keating, M.J. (1992). Prognostic significance of elevated serum beta 2-microglobulin levels in adult acute lymphocytic leukemia. *Am J Med* **93**, 599-604.

Kapur, R., Cooper, R., Zhang, L. y Williams, D.A. (2001). Cross-talk between alpha(4)beta(1)/alpha(5)beta(1) and c-Kit results in opposing effect on growth and survival of hematopoietic cells via the activation of focal adhesion kinase, mitogen-activated protein kinase, and Akt signaling pathways. *Blood* **97**, 1975-81.

Keating, M.J., Chiorazzi, N., Messmer, B., Damie, R.N., Allen, S.L., Rai, K.R., Ferrarini, M. y Kipps, T.J. (2003). Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 153-75.

- Kertesz, N., Krasnoperov, V., Reddy, R., Leshanski, L., Kumar, S.R., Zozulya, S. y Gill, P.S. (2006). The soluble extracellular domain of EphB4 (sEphB4) antagonizes EphB4-EphrinB2 interaction, modulates angiogenesis, and inhibits tumor growth. *Blood* **107**, 2330-8.
- Kinashi, T. (2005). Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* **5**, 546-59.
- Klein, R. (2004). Eph/ephrin signaling in morphogenesis, neural development and plasticity. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 580-9.
- Klein, U. y Dalla-Favera, R. (2008). Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* **8**, 22-33.
- Klein, U. y Dalla-Favera, R. (2010). New insights into the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Cancer Biol* **20**, 377-83.
- Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Mattioli, M., Cattoretti, G., Husson, H., Freedman, A., Inghirami, G., Cro, L., Baldini, L. y cols. (2001). Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* **194**, 1625-38.
- Knoll, B. y Drescher, U. (2002). Ephrin-As as receptors in topographic projections. *Trends Neurosci* **25**, 145-9.
- Knoll, B. y Drescher, U. (2004). Src family kinases are involved in EphA receptor-mediated retinal axon guidance. *J Neurosci* **24**, 6248-57.
- Kobayashi, H., Butler, J.M., O'Donnell, R., Kobayashi, M., Ding, B.S., Bonner, B., Chiu, V.K., Nolan, D.J., Shido, K., Benjamin, L. y cols. (2010). Angiocrine factors from Akt-activated endothelial cells balance self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol* **12**, 1046-56.
- Kokkonen, T.S., Augustin, M.T., Makinen, J.M., Kokkonen, J. y Karttunen, T.J. (2004). High endothelial venules of the lymph nodes express Fas ligand. *J Histochem Cytochem* **52**, 693-9.
- Konstantinova, I., Nikolova, G., Ohara-Imaizumi, M., Meda, P., Kucera, T., Zarbalis, K., Wurst, W., Nagamatsu, S. y Lammert, E. (2007). EphA-Ephrin-A-mediated beta cell communication regulates insulin secretion from pancreatic islets. *Cell* **129**, 359-70.
- Krober, A., Bloehdorn, J., Hafner, S., Buhler, A., Seiler, T., Kienle, D., Winkler, D., Bangerter, M., Schlenk, R.F., Benner, A. y cols. (2006). Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* **24**, 969-75.
- Krober, A., Seiler, T., Benner, A., Bulinger, L., Bruckle, E., Lichter, P., Dohner, H. y Stilgenbauer, S. (2002). V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **100**, 1410-6.
- Krzyzowska, M., Sabri, F., De Milito, A., Missailidis, C., Schollenberger, A., Niemialtowski, M.G. y Chiodi, F. (2001). Cross-linking of LFA-1 molecule enhances Fas mediated apoptosis of Jurkat and Burkitt lymphoma cell lines. *Cell Death Differ* **8**, 1123-4.
- Kullander, K. y Klein, R. (2002). Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 475-86.
- Kullander, K., Mather, N.K., Diella, F., Dottori, M., Boyd, A.W. y Klein, R. (2001). Kinase-dependent and kinase-independent functions of EphA4 receptors in major axon tract formation in vivo. *Neuron* **29**, 73-84.

- Lagneaux, L., Delforge, A., Bron, D., De Bruyn, C. y Stryckmans, P. (1998). Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells *Blood* **91**, 2387-96.
- Lai, K.O., Ip, F.C. y Ip, N.Y. (1999). Identification and characterization of splice variants of ephrin-A3 and ephrin-A5. *FEBS Lett* **458**, 265-9.
- Larson, J., Schomberg, S., Schroeder, W. y Carpenter, T.C. (2008). Endothelial EphA receptor stimulation increases lung vascular permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **295**, L431-9.
- Lidington, E.A., Moyes, D.L., McCormack, A.M. y Rose, M.L. (1999). A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions. *Transpl Immunol* **7**, 239-46.
- Long, B.W., Witte, P.L., Abraham, G.N., Gregory, S.A. y Plate, J.M. (1995). Apoptosis and interleukin 7 gene expression in chronic B-lymphocytic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1416-20.
- Lopez-Giral, S., Quintana, N.E., Cabrerizo, M., Alfonso-Perez, M., Sala-Vaides, M., De Soria, V.G., Fernandez-Ranada, J.M., Fernandez-Ruiz, E. y Munoz, C. (2004). Chemokine receptors that mediate B cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination. *J Leukoc Biol* **76**, 462-71.
- Lu, Q., Sun, E.E., Klein, R.S. y Flanagan, J.G. (2001). Ephrin-B reverse signaling is mediated by a novel PDZ-RGS protein and selectively inhibits G protein-coupled chemoattraction. *Cell* **105**, 69-79.
- Luo, H., Wan, X., Wu, Y. y Wu, J. (2001). Cross-linking of EphB6 resulting in signal transduction and apoptosis in Jurkat cells. *J Immunol* **167**, 1362-70.
- Luo, H., Yu, G., Tremblay, J. y Wu, J. (2004). EphB6-null mutation results in compromised T cell function. *J Clin Invest* **114**, 1762-73.
- Luo, H., Yu, G., Wu, Y. y Wu, J. (2002). EphB6 crosslinking results in costimulation of T cells. *J Clin Invest* **110**, 1141-50.
- Luster, A.D., Alon, R. y von Andrian, U.H. (2005). Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* **6**, 1182-90.
- Mainou-Fowler, T. y Prentice, A.G. (1996). Modulation of apoptosis with cytokines in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma* **21**, 369-77.
- Marston, D.J., Dickinson, S. y Nobes, C.D. (2003). Rac-dependent trans-endocytosis of ephrinBs regulates Eph-ephrin contact repulsion. *Nat Cell Biol* **5**, 879-88.
- McConkey, D.J., Aguilar-Santelises, M., Hartzell, P., Eriksson, I., Mellstedt, H., Orrenius, S. y Jondal, M. (1991). Induction of DNA fragmentation in chronic B-lymphocytic leukemia cells. *J Immunol* **146**, 1072-6.
- Mellitzer, G., Xu, Q. y Wilkinson, D.G. (1999). Eph receptors and ephrins restrict cell intermingling and communication. *Nature* **400**, 77-81.
- Merlos-Suarez, A. y Batlle, E. (2008). Eph-ephrin signalling in adult tissues and cancer. *Curr Opin Cell Biol.*
- Messmer, B.T., Messmer, D., Allen, S.L., Kolitz, J.E., Kudalkar, P., Cesar, D., Murphy, E.J., Koduru, P., Ferrarini, M., Zupo, S. y cols. (2005). In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest* **115**, 755-64.
- Meyer, S., Hafner, C., Guba, M., Flegel, S., Geissler, E.K., Becker, B., Koehl, G.E., Orso, E., Landthaler, M. y Vogt, T. (2005). Ephrin-B2 overexpression enhances integrin-mediated ECM-attachment and migration of B16 melanoma cells. *Int J Oncol* **27**, 1197-206.

- Millan, J., Hewlett, L., Glyn, M., Toomre, D., Clark, P. y Ridley, A.J. (2006). Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nat Cell Biol* **8**, 113-23.
- Miura, K., Nam, J.M., Kojima, C., Mochizuki, N. y Sabe, H. (2009). EphA2 engages Git1 to suppress Arf6 activity modulating epithelial cell-cell contacts. *Mol Biol Cell* **20**, 1949-59.
- Molica, S., Vitelli, G., Mirabelli, R., Digiesu, G., Giannarelli, D., Cuneo, A., Ribatti, D. y Vacca, A. (2006). Serum levels of syndecan-1 in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with the extent of angiogenesis and disease-progression risk in early disease. *Leuk Lymphoma* **47**, 1034-40.
- Montserrat, E., Sanchez-Bisoso, J., Vinolas, N. y Rozman, C. (1986). Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol* **62**, 567-75.
- Moreno, A., Villar, M.L., Camara, C., Luque, R., Cespon, C., Gonzalez-Porte, P., Roy, G., Lopez-Jimenez, J., Bootello, A. y Santiago, E.R. (2001). Interleukin-6 dimers produced by endothelial cells inhibit apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* **97**, 242-9.
- Moreno, C. y Montserrat, E. (2008). New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev* **22**, 211-9.
- Moss, A., Alvares, D., Meredith-Middleton, J., Robinson, M., Slater, R., Hunt, S.P. y Fitzgerald, M. (2005). Ephrin-A4 inhibits sensory neurite outgrowth and is regulated by neonatal skin wounding. *Eur J Neurosci* **22**, 2413-21.
- Muller, W.A. (2009). Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes. *Circ Res* **105**, 223-30.
- Munk Pedersen, I. y Reed, J. (2004). Microenvironmental interactions and survival of CLL B-cells. *Leuk Lymphoma* **45**, 2365-72.
- Munoz, J.J., Alfaro, D., Garcia-Ceca, J., Alonso, C.L., Jimenez, E. y Zapata, A. (2006). Thymic alterations in EphA4-deficient mice. *J Immunol* **177**, 804-13.
- Munoz, J.J., Alonso, C.L., Sacedon, R., Crompton, T., Vicente, A., Jimenez, E., Varas, A. y Zapata, A.G. (2002). Expression and function of the Eph A receptors and their ligands ephrins A in the rat thymus. *J Immunol* **169**, 177-84.
- Munthe, E., Finne, E.F. y Aasheim, H.C. (2004). Expression and functional effects of Eph receptor tyrosine kinase A family members on Langerhans like dendritic cells. *BMC Immunol* **5**, 9.
- Murai, K.K. y Pasquale, E.B. (2003). 'Eph'ective signaling: forward, reverse and crosstalk. *J Cell Sci* **116**, 2823-32.
- Nagashima, K., Endo, A., Ogita, H., Kawana, A., Yamagishi, A., Kitabatake, A., Matsuda, M. y Mochizuki, N. (2002). Adaptor protein Crk is required for ephrin-B1-induced membrane ruffling and focal complex assembly of human aortic endothelial cells. *Mol Biol Cell* **13**, 4231-42.
- Nakanishi, H., Nakamura, T., Canaani, E. y Croce, C.M. (2007). ALL1 fusion proteins induce deregulation of EphA7 and ERK phosphorylation in human acute leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14442-7.
- Nieminen, M., Henttinen, T., Merinen, M., Marttila-Ichihara, F., Eriksson, J.E. y Jalkanen, S. (2006). Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. *Nat Cell Biol* **8**, 156-62.
- Nieto, W.G., Almeida, J., Romero, A., Teodosio, C., Lopez, A., Henriques, A.F., Sanchez, M.L., Jara-Acevedo, M., Rasillo, A., Gonzalez, M. y cols. (2009). Increased frequency (12%) of circulating chronic

lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach. *Blood* **114**, 33-7.

Noren, N.K. y Pasquale, E.B. (2007). Paradoxes of the EphB4 receptor in cancer. *Cancer Res* **67**, 3994-7.

O'Brien, S. y Kay, N.E. (2011). Maintenance therapy for B-chronic lymphocytic leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol* **9**, 22-31.

Ocana, E., Delgado-Perez, L., Campos-Caro, A., Munoz, J., Paz, A., Franco, R. y Brieva, J.A. (2007). The prognostic role of CXCR3 expression by chronic lymphocytic leukemia B cells. *Haematologica* **92**, 349-56.

Orchard, J.A., Ibbotson, R.E., Davis, Z., Wiestner, A., Rosenwald, A., Thomas, P.W., Hamblin, T.J., Staudt, L.M. y Oscier, D.G. (2004). ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* **363**, 105-11.

Oscier, D.G., Gardiner, A.C., Mould, S.J., Glide, S., Davis, Z.A., Ibbotson, R.E., Corcoran, M.M., Chapman, R.M., Thomas, P.W., Copplestone, J.A. y cols. (2002). Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* **100**, 1177-84.

Paessens, L.C., Singh, S.K., Fernandes, R.J. y van Kooyk, Y. (2008). Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) provide co-stimulation in positive selection along with survival of selected thymocytes. *Mol Immunol* **45**, 42-8.

Palmer, A., Zimmer, M., Erdmann, K.S., Eulenburg, V., Porthin, A., Heumann, R., Deutsch, U. y Klein, R. (2002). EphrinB phosphorylation and reverse signaling: regulation by Src kinases and PTP-BL phosphatase. *Mol Cell* **9**, 725-37.

Panayiotidis, P., Jones, D., Ganeshaguru, K., Foroni, L. y Hoffbrand, A.V. (1996). Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br J Haematol* **92**, 97-103.

Pandey, A., Shao, H., Marks, R.M., Polverini, P.J. y Dixit, V.M. (1995). Role of B61, the ligand for the Eck receptor tyrosine kinase, in TNF-alpha-induced angiogenesis. *Science* **268**, 567-9.

Parfienczyk, A., Kiersnowska-Rogowska, B. y Rogowski, F. (2003). Cytokine and adhesion molecule concentrations in blood of patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia with regard to disease progression. *Rocz Akad Med Bialymst* **48**, 90-4.

Pascall, J.C. y Brown, K.D. (2004). Intramembrane cleavage of ephrinB3 by the human rhomboid family protease, RHBDL2. *Biochem Biophys Res Commun* **317**, 244-52.

Pasquale, E.B. (2005). Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 462-75.

Pasquale, E.B. (2008). Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* **133**, 38-52.

Pasquale, E.B. (2010). Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. *Nat Rev Cancer* **10**, 165-80.

Patten, P.E., Buggins, A.G., Richards, J., Wotherspoon, A., Salisbury, J., Mufti, G.J., Hamblin, T.J. y Devereux, S. (2008). CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood* **111**, 5173-81.

Pedersen, I.M., Kitada, S., Leoni, L.M., Zapata, J.M., Karras, J.G., Tsukada, N., Kipps, T.J., Choi, Y.S., Bennett, F. y Reed, J.C. (2002). Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. *Blood* **100**, 1795-801.

- Plander, M., Seegers, S., Ugocsai, P., Diermeier-Daucher, S., Ivanyi, J., Schmitz, G., Hofstadter, F., Schwarz, S., Orso, E., Knuchel, R. y cols. (2009). Different proliferative and survival capacity of CLL-cells in a newly established in vitro model for pseudofollicles. *Leukemia* **23**, 2118-28.
- Poliakov, A., Cotrina, M. y Wilkinson, D.G. (2004). Diverse roles of eph receptors and ephrins in the regulation of cell migration and tissue assembly. *Dev Cell* **7**, 465-80.
- Rai, K.R. y Han, T. (1990). Prognostic factors and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* **4**, 447-56.
- Rai, K.R., Sawitsky, A., Cronkite, E.P., Chanana, A.D., Levy, R.N. y Pasternack, B.S. (1975). Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **46**, 219-34.
- Rassenti, L.Z., Huynh, L., Toy, T.L., Chen, L., Keating, M.J., Gribben, J.G., Neuberg, D.S., Flinn, I.W., Rai, K.R., Byrd, J.C. y cols. (2004). ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **351**, 893-901.
- Rassenti, L.Z., Jain, S., Keating, M.J., Wierda, W.G., Grever, M.R., Byrd, J.C., Kay, N.E., Brown, J.R., Gribben, J.G., Neuberg, D.S. y cols. (2008). Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **112**, 1923-30.
- Rawstron, A.C., Yulle, M.R., Fuller, J., Cullen, M., Kennedy, B., Richards, S.J., Jack, A.S., Matutes, E., Catovsky, D., Hillmen, P. y cols. (2002). Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion. *Blood* **100**, 2289-90.
- Redondo-Munoz, J., Ugarte-Berzal, E., Garcia-Marco, J.A., del Cerro, M.H., Van den Steen, P.E., Opdenakker, G., Terol, M.J. y Garcia-Pardo, A. (2008). Alpha4beta1 integrin and 190-kDa CD44v constitute a cell surface docking complex for gelatinase B/MMP-9 in chronic leukemic but not in normal B cells. *Blood* **112**, 169-78.
- Redondo-Munoz, J., Ugarte-Berzal, E., Terol, M.J., Van den Steen, P.E., Hernandez del Cerro, M., Roderfeld, M., Roeb, E., Opdenakker, G., Garcia-Marco, J.A. y Garcia-Pardo, A. (2010). Matrix metalloproteinase-9 promotes chronic lymphocytic leukemia b cell survival through its hemopexin domain. *Cancer Cell* **17**, 160-72.
- Reittie, J.E., Yong, K.L., Panayiotidis, P. y Hoffbrand, A.V. (1996). Interleukin-6 inhibits apoptosis and tumour necrosis factor induced proliferation of B-chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma* **22**, 83-90, follow 186, color plate VI.
- Richardson, S.J., Matthews, C., Catherwood, M.A., Alexander, H.D., Carey, B.S., Farrugia, J., Gardiner, A., Mould, S., Oscier, D., Copplestone, J.A. y cols. (2006). ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* **107**, 3584-92.
- Rodrigo Mora, J. y Von Andrian, U.H. (2006). Specificity and plasticity of memory lymphocyte migration. *Curr Top Microbiol Immunol* **308**, 83-116.
- Rosen, A., Murray, F., Evaldsson, C. y Rosenquist, R. (2010). Antigens in chronic lymphocytic leukemia--implications for cell origin and leukemogenesis. *Semin Cancer Biol* **20**, 400-9.
- Rosenwald, A., Alizadeh, A.A., Widhopf, G., Simon, R., Davis, R.E., Yu, X., Yang, L., Pickeral, O.K., Rassenti, L.Z., Powell, J. y cols. (2001). Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* **194**, 1639-47.

- Rozman, C., Montserrat, E., Rodriguez-Fernandez, J.M., Ayats, R., Vallespi, T., Parody, R., Rios, A., Prados, D., Morey, M., Gomis, F. y cols. (1984). Bone marrow histologic pattern--the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 329 cases. *Blood* **64**, 642-8.
- Salmi, M. y Jalkanen, S. (2005). Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nat Rev Immunol* **5**, 760-71.
- Sata, M. y Walsh, K. (1998). TNFalpha regulation of Fas ligand expression on the vascular endothelium modulates leukocyte extravasation. *Nat Med* **4**, 415-20.
- Schmitt, A.M., Shi, J., Wolf, A.M., Lu, C.C., King, L.A. y Zou, Y. (2006). Wnt-Ryk signalling mediates medial-lateral retinotectal topographic mapping. *Nature* **439**, 31-7.
- Seller, T., Dohner, H. y Stilgenbauer, S. (2006). Risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* **33**, 186-94.
- Sharfe, N., Freywald, A., Toro, A., Dadi, H. y Roifman, C. (2002). Ephrin stimulation modulates T cell chemotaxis. *Eur J Immunol* **32**, 3745-55.
- Shim, Y.K., Middleton, D.C., Caporaso, N.E., Rachel, J.M., Landgren, O., Abbasi, F., Raveche, E.S., Rawstron, A.C., Orfao, A., Marti, G.E. y cols. (2010). Prevalence of monoclonal B-cell lymphocytosis: a systematic review. *Cytometry B Clin Cytom* **78 Suppl 1**, S10-8.
- Smith, F.M., Vearing, C., Lackmann, M., Treutlein, H., Himanen, J., Chen, K., Saul, A., Nikolov, D. y Boyd, A.W. (2004). Dissecting the EphA3/Ephrin-A5 interactions using a novel functional mutagenesis screen. *J Biol Chem* **279**, 9522-31.
- Springer, T.A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**, 301-14.
- Stauder, R., Hamader, S., Fasching, B., Kemmler, G., Thaler, J. y Huber, H. (1993). Adhesion to high endothelial venules: a model for dissemination mechanisms in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* **82**, 262-7.
- Staudt, L.M. y Dave, S. (2005). The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling. *Adv Immunol* **87**, 163-208.
- Stein, E., Lane, A.A., Cerretti, D.P., Schoecklmann, H.O., Schroff, A.D., Van Etten, R.L. y Daniel, T.O. (1998). Eph receptors discriminate specific ligand oligomers to determine alternative signaling complexes, attachment, and assembly responses. *Genes Dev* **12**, 667-78.
- Steube, K.G., Meyer, C., Habig, S., Uphoff, C.C. y Drexler, H.G. (1999). Expression of receptor tyrosine kinase HTK (hepatoma transmembrane kinase) and HTK ligand by human leukemia-lymphoma cell lines. *Leuk Lymphoma* **33**, 371-6.
- Stilgenbauer, S., Bullinger, L., Lichter, P. y Dohner, H. (2002). Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia* **16**, 993-1007.
- Sugahara, H., Kanakura, Y., Furitsu, T., Ishihara, K., Oritani, K., Ikeda, H., Kitayama, H., Ishikawa, J., Hashimoto, K., Kanayama, Y. y cols. (1994). Induction of programmed cell death in human hematopoietic cell lines by fibronectin via its interaction with very late antigen 5. *J Exp Med* **179**, 1757-66.
- Takeuchi, H. y Katayama, I. (1993). Surface phenotype and adhesion activity of B-cell chronic lymphoid leukemias. *Leuk Lymphoma* **10**, 209-16.
- Tanaka, M., Sasaki, K., Kamata, R. y Sakai, R. (2007). The C-terminus of ephrin-B1 regulates metalloproteinase secretion and invasion of cancer cells. *J Cell Sci* **120**, 2179-89.

- Terui, Y., Furukawa, Y., Sakai, T., Kikuchi, J., Sugahara, H., Kanakura, Y., Kitagawa, S. y Miura, Y. (1996). Up-regulation of VLA-5 expression during monocytic differentiation and its role in negative control of the survival of peripheral blood monocytes. *J Immunol* **156**, 1981-8.
- Till, K.J., Lin, K., Zuzel, M. y Cawley, J.C. (2002). The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. *Blood* **99**, 2977-84.
- Tobin, G., Rosen, A. y Rosenquist, R. (2006). What is the current evidence for antigen involvement in the development of chronic lymphocytic leukemia? *Hematol Oncol* **24**, 7-13.
- Trentin, L., Cabrelle, A., Facco, M., Carollo, D., Miorin, M., Tosoni, A., Pizzo, P., Binotto, G., Nicolardi, L., Zambello, R. y cols. (2004). Homeostatic chemokines drive migration of malignant B cells in patients with non-Hodgkin lymphomas. *Blood* **104**, 502-8.
- Trinidad, E.M., Ballesteros, M., Zuloaga, J., Zapata, A. y Alonso-Colmenar, L.M. (2009). An impaired transendothelial migration potential of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells can be linked to ephrin-A4 expression. *Blood* **114**, 5081-90.
- Trinidad, E.M., Zapata, A.G. y Alonso-Colmenar, L.M. (2010). Eph-ephrin bidirectional signaling comes into the context of lymphocyte transendothelial migration. *Cell Adh Migr* **4**, 363-7.
- Tsukada, N., Burger, J.A., Zvaifler, N.J. y Kipps, T.J. (2002). Distinctive features of "nurselike" cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **99**, 1030-7.
- Unsinger, J., McGlynn, M., Kasten, K.R., Hoekzema, A.S., Watanabe, E., Muenzer, J.T., McDonough, J.S., Tschoep, J., Ferguson, T.A., McDunn, J.E. y cols. (2010). IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis. *J Immunol* **184**, 3768-79.
- van der Flier, A. y Sonnenberg, A. (2001). Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* **305**, 285-98.
- Vincent, A.M., Cawley, J.C. y Burthem, J. (1996). Integrin function in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **87**, 4780-8.
- Walsh, K. y Sata, M. (1999). Is extravasation a Fas-regulated process? *Mol Med Today* **5**, 61-7.
- Watanabe, T. y Takahashi, Y. (2010). Tissue morphogenesis coupled with cell shape changes. *Curr Opin Genet Dev*.
- Wicks, I.P., Wilkinson, D., Salvaris, E. y Boyd, A.W. (1992). Molecular cloning of HEK, the gene encoding a receptor tyrosine kinase expressed by human lymphoid tumor cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1611-5.
- Wierda, W.G., O'Brien, S., Wang, X., Faderl, S., Ferrajoli, A., Do, K.A., Garcia-Manero, G., Cortes, J., Thomas, D., Koller, C. y cols. (2009). Characteristics associated with important clinical end points in patients with chronic lymphocytic leukemia at initial treatment. *J Clin Oncol* **27**, 1637-43.
- Wiestner, A., Rosenwald, A., Barry, T.S., Wright, G., Davis, R.E., Henrickson, S.E., Zhao, H., Ibbotson, R.E., Orchard, J.A., Davis, Z. y cols. (2003). ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* **101**, 4944-51.
- Wilkinson, D.G. (2001). Multiple roles of EPH receptors and ephrins in neural development. *Nat Rev Neurosci* **2**, 155-64.
- Wimmer-Kleikamp, S.H. y Lackmann, M. (2005). Eph-modulated cell morphology, adhesion and motility in carcinogenesis. *IUBMB Life* **57**, 421-31.

- Wittchen, E.S.** (2009). Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration. *Front Biosci* **14**, 2522-45.
- Wu, C., Butz, S., Ying, Y. y Anderson, R.G.** (1997). Tyrosine kinase receptors concentrated in caveolae-like domains from neuronal plasma membrane. *J Biol Chem* **272**, 3554-9.
- Wu, J. y Luo, H.** (2005). Recent advances on T-cell regulation by receptor tyrosine kinases. *Curr Opin Hematol* **12**, 292-7.
- Yamaguchi, Y. y Pasquale, E.B.** (2004). Eph receptors in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol* **14**, 288-96.
- Yin, Y., Yamashita, Y., Noda, H., Okafuji, T., Go, M.J. y Tanaka, H.** (2004). EphA receptor tyrosine kinases interact with co-expressed ephrin-A ligands in cis. *Neurosci Res* **48**, 285-96.
- Yong, K. y Khwaja, A.** (1990). Leucocyte cellular adhesion molecules. *Blood Rev* **4**, 211-25.
- Yu, G., Luo, H., Wu, Y. y Wu, J.** (2003). Mouse ephrinB3 augments T-cell signaling and responses to T-cell receptor ligation. *J Biol Chem* **278**, 47209-16.
- Yu, G., Luo, H., Wu, Y. y Wu, J.** (2004). EphrinB1 is essential in T-cell-T-cell co-operation during T-cell activation. *J Biol Chem* **279**, 55531-9.
- Yu, G., Mao, J., Wu, Y., Luo, H. y Wu, J.** (2006). Ephrin-B1 is critical in T-cell development. *J Biol Chem* **281**, 10222-9.
- Zantek, N.D., Azimi, M., Fedor-Chaiken, M., Wang, B., Brackenbury, R. y Kinch, M.S.** (1999). E-cadherin regulates the function of the EphA2 receptor tyrosine kinase. *Cell Growth Differ* **10**, 629-38.
- Zenz, T., Frohling, S., Mertens, D., Dohner, H. y Stilgenbauer, S.** (2010a). Moving from prognostic to predictive factors in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Best Pract Res Clin Haematol* **23**, 71-84.
- Zenz, T., Mertens, D., Kupperts, R., Dohner, H. y Stilgenbauer, S.** (2010b). From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* **10**, 37-50.
- Zimmer, M., Palmer, A., Kohler, J. y Klein, R.** (2003). EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nat Cell Biol* **5**, 869-78.
- Zisch, A.H., Pazzagli, C., Freeman, A.L., Schneller, M., Hadman, M., Smith, J.W., Ruoslahti, E. y Pasquale, E.B.** (2000). Replacing two conserved tyrosines of the EphB2 receptor with glutamic acid prevents binding of SH2 domains without abrogating kinase activity and biological responses. *Oncogene* **19**, 177-87.
- Zucchetto, A., Benedetti, D., Tripodo, C., Bomben, R., Dal Bo, M., Marconi, D., Bossi, F., Lorenzon, D., Degan, M., Rossi, F.M. y cols.** (2009). CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Cancer Res* **69**, 4001-9.
- Zupo, S., Isnardi, L., Megna, M., Massara, R., Malavasi, F., Dono, M., Cosulich, E. y Ferrarini, M.** (1996). CD38 expression distinguishes two groups of B-cell chronic lymphocytic leukemias with different responses to anti-IgM antibodies and propensity to apoptosis. *Blood* **88**, 1365-74.
- Zwiebel, J.A. y Cheson, B.D.** (1998). Chronic lymphocytic leukemia: staging and prognostic factors. *Semin Oncol* **25**, 42-59.

Anexo I

Molécula CD Antígeno	Nombre Alternativo	Expresión celular	Ligando/Receptor Asociado	Función
CD2	T11, LFA-2, SRBC-R	T, Timocitos, NK, subpoblación B subpoblación Monocitos	CD58, CD59, CD15	Adhesión, activación T
CD3	T3	T maduros, diferentes niveles en Timocitos	A: CD3/complejo TcR	Señalización de T activados, regula expresión de TcR
CD5	T1, Tp67, Leu-1, Ly-1	Timocitos, T, Subpoblación B, LLC-B	CD72, A: TCR α CR	Regula Interacción T-B
CD10	CALLA, NEP, gp100	Precursores B y T, Fibroblastos, neutrófilos	-	Peptidasa, regula crecimiento B
CD11a	LFA-1, Integrina α L	Leucocitos	CD11a/CD18, uniones a CD54, CD102, CD50, CD242	Adhesión y co-estimulación
CD13	APN, gp150	Granulocitos, Monocitos y sus precursores, Endoteliales, Epiteliales, Dendríticas	Coronavirus, CMV, L-leucyl- β -naphthylamine	Aminopeptidasa N, adhesión, coronavirus R
CD14	LPS R	Monocitos, Macrófagos, Langerhans, Granulocitos (bajo)	LPS	Receptor para el complejo LPS y LBP, respuesta inmune innata
CD18	Integrina β 2	Leucocitos	A: CD11a, b y c, uniones y CAMs, ECM	Adhesión
CD19	B4	B (pero no Plasmáticas), FDC	A: CD21, CD81, CD225, BCR	Co-receptor BcR, señalización
CD20	B1, Bp-35, Ly-44	Célula B y Sub-población T	-	Activación y proliferación B
CD21	CR2, EBV-R, C3dR	B maduro, FDC, Sub-población T	C3d, EBV, CD23, A: CD19, CD81, CD225, BcR	Señalización
CD22	BL-CAM, Siglec-2	B	CD22, IgM, CD45RO, sialo-glico-conjugado NeuGc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc	Adhesión y señalización
CD23	Fc ϵ RII, BLAST-2	(Aprelupa hasta activación) B, activación Macrófagos, Eosinófilos, FDC, Plaquetas, Epitelio Intestinal	IgE, CD21, CD11b, CD11c	Baja afinidad R para IgE, respuesta alérgica, activación

Molécula CD Antígeno	Nombre Alternativo	Expresión celular	Ligando/Receptor Asociado	Función
CD29	Integrina $\beta 1$, gp1a	T, B, Monocitos, Granulocitos (bajo), Plaquetas, Mastocitos, Fibroblastos, Endoteliales, NK	VCAM-1, MADCAM-1, ECM	A: subunidades α integrina, adhesión, activación, embriogénesis
CD31	PECAM-1, endocam	Monocitos, Plaquetas, Granulocitos, Endoteliales, Sub-población Linfocitaria	CD31, CD38	Adhesión
CD38	T10, ADP- ribosiliclasa	Niveles variables sobre la mayoría de células Hematopoyéticas y algunas no Hematopoyéticas, alto en Plasmáticas	CD31	Activación celular, proliferación y adhesión
CD40	Bp50, TNFRSF5	B, Monocitos/Macrófagos, FDC Endoteliales, Fibroblastos, Queratinocitos	CD154	Co-estimulación, diferenciación y cambio de isotipo
CD44	H-CAM, Pgp-1, EMCR111, CD44s	Células Hema- y no Hematopoyéticas, excepto Plaquetas	Ácido Hialurónico	Rolling leucocitos, homing, y agregación
CD49d	VLA-4 α , Integrina $\alpha 4$	B, T, Timocitos, Monocitos, Eosinófilos, Basófilos, NK, Mastocitos, Dendríticas, Precursores Eritroblásticos	A: CD29 o integrina $\beta 7$, uniones VCAM-1, MAdCAM-1, fibronectina, CD242	Adhesión, migración, re- circularización y activación
CD54	ICAM-1	Endoteliales, Epiteliales, Monocitos, Linfocitos en reposo bajo, estimulados alto	CD11a/CD18 CD11b/CD18 Rhinovirus, CD43	Extravasación de leucocitos desde vasos sanguíneos, regula T activados
CD56	NCAM, Leu-19, NKH-1	Tejido neuronal, NK, Subpoblación T, Células pequeñas de carcinoma de pulmón	NK, Heparán sulfato	Adhesión Homofílica y Heterofílica
CD62L	L-selectina, LECAM-1, LAM-1	B, Subpoblación T, Monocitos, Granulocitos, NK, Timocitos	C34, MADCAM-1, GlyCAM-1	Rolling y homing leucocitos
CD96	FAS	TACTILE	NK, sub-población linfocitos T (sobrexpresada tras activación)	Adhesión
CD106	VCAM-1 INCAM-110	Endoteliales activadas, FDC, células madre mesenquimales	CD49d/CD29 Integrina $\alpha 9/\beta 1$	Adhesión leucocitaria, trans migración y co-estimulación

Anexos II-IV

Tabla 1. Anticuerpos conjugados directamente a fluorocromo. Todos los anticuerpos son de isotipo IgG, están desarrollados en ratón contra humano.

Anticuerpo	Características	FL-1	FL-2	FL-3	FL-4
CD3	Fluorocromo Casa Comercial Clon	FITC <i>BD Biosciences</i> UCHT1	PE <i>BD Biosciences</i> HIT3a	PE-Cy5 <i>BD Biosciences</i> HIT3a	APC <i>BD Biosciences</i> UCHT1
CD5	Fluorocromo Casa Comercial Clon			PE-Cy5 <i>BD Biosciences</i> UCHT2	
CD10	Fluorocromo Casa Comercial Clon	FITC <i>BD Biosciences</i> W8E7			
CD11a	Fluorocromo Casa Comercial Clon				APC <i>BD Biosciences</i> HI111
CD18	Fluorocromo Casa Comercial Clon			PE-Cy5 <i>BD Biosciences</i> 6.7	
CD19	Fluorocromo Casa Comercial Clon	FITC <i>BD Biosciences</i> HIB19	PE <i>BD Biosciences</i> HIB19	PE-Cy5 <i>BD Biosciences</i> HIB19	APC <i>BD Biosciences</i> HIB19
CD23	Fluorocromo Casa Comercial Clon		PE <i>BD Biosciences</i> M-L233		
CD29	Fluorocromo Casa Comercial Clon		PE <i>Immunostep</i> VJ1/14		APC <i>BD Biosciences</i> MAR4
CD31	Fluorocromo Casa Comercial Clon	Alexa Fluor®488 <i>BD Biosciences</i> MD89D3			Alexa Fluor®647 <i>BD Biosciences</i> M89D3
CD38	Fluorocromo Casa Comercial Clon				APC <i>BD Biosciences</i> HIT2
CD40	Fluorocromo Casa Comercial Clon	FITC <i>BD Biosciences</i> 5C3			
CD44	Fluorocromo Casa Comercial Clon	FITC <i>BD Biosciences/</i> <i>Immunostep</i> G44-26/HP2/9			
CD49d	Fluorocromo Casa Comercial Clon			PE-Cy5 <i>BD Biosciences</i> 9F10	
CD54	Fluorocromo Casa Comercial Clon			PE-Cy5 <i>BD Biosciences</i> HA58	
CD62L	Fluorocromo Casa Comercial Clon		PE <i>BD Biosciences</i> Dreg 56		
CD106	Fluorocromo Casa Comercial Clon				APC <i>BD Biosciences</i> 51-10C9
ZAP-70	Fluorocromo Casa Comercial Clon		PE <i>BD Biosciences</i> IE7.2		

Tabla 2. Anticuerpos purificados para aislamientos y estimulaciones. Todos los anticuerpos son de isotipo IgG, están desarrollados en ratón contra humano, a excepción α -h-IgM está desarrollado en cabra.

Anticuerpo	Casa Comercial	Clon
CD2	BD Biosciences	RPA-2.10
CD3	<i>BD Biosciences</i>	HIT3a
CD5-b	BD Biosciences	UCHT2
CD13	<i>BD Biosciences</i>	WM15
CD14	BD Biosciences	M5E2
CD19	<i>BD Biosciences</i>	HIB19
CD19-b	Immunostep	A3-B1
CD28	<i>BD Biosciences</i>	CD28.2
CD31	BD Biosciences	WM59
CD56	<i>BD Biosciences</i>	B159
IgM	Jackson Immuno Research	Policlonal

Tabla 3. Anticuerpos Eph/EFN.

Anticuerpo	Casa Comercial	Referencia	Dominio	Desarrollado en	Reconoce especie	Clon	Isotipo
EFNA4-b	R&D Systems	BAF369	extracelular	cabra	α -humano	Policlonal	IgG
EFNA4	<i>R&D Systems</i>	AF369	extracelular	cabra	α -humano	Policlonal	IgG
EphA2	R&D Systems	AF3035	extracelular	cabra	α -humano	Policlonal	IgG
EphA2	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>	SC-924	intracelular	conejo	α -ratón (humano)	Policlonal	IgG
EphA3	Santa Cruz Biotechnology	SC-920	extracelular	conejo	α -humano (ratón)	Policlonal	IgG
EphA4	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>	SC-921	intracelular	conejo	α -humano (ratón)	Policlonal	IgG
EphA8-b	R&D Systems	BAF454	extracelular	cabra	α -ratón	Policlonal	IgG
EphB6	<i>R&D Systems</i>	AF3384	extracelular	oveja	α -humano	Policlonal	IgG

Tabla 4. Proteínas recombinantes Eph/EFN.

Proteína	Expresado en	Casa Comercial	Referencia	Estructura de la molécula				
				N-terminal			C-terminal	
EFNA4-Fc	Línea celular de mieloma de ratón	<i>R&D Systems</i>	369-EA	Humana	Homodímero	IEGRMD	Fc	HHHHHH
EphA2-Fc	Línea celular de mieloma de ratón	<i>R&D Systems</i>	639-A2	Murina	Homodímero	IEGRMD	Fc	HHHHHH

NOTA: El dominio extracelular de EphA2 humano comparte una semejanza con el de ratón mayor al 92%.

Tabla 5. Proteínas y anticuerpos secundarios. Los anticuerpos aquí citados son policlonales.

Molécula/ Anticuerpo	Casa Comercial	Fluorocromo
SAV	<i>Jackson-ImmunoResearch</i>	-
	<i>Molecular Probes, Invitrogen</i>	Alexa Fluor [®] 405
	<i>Molecular Probes, Invitrogen</i>	Alexa Fluor[®] 488
Burro-α-cabra-IgG	<i>Molecular Probes, Invitrogen</i>	Alexa Fluor [®] 488
	<i>Molecular Probes, Invitrogen</i>	Alexa Fluor[®] 546
Burro-α-conejo-IgG	<i>Molecular Probes, Invitrogen</i>	Alexa Fluor [®] 488
	<i>Molecular Probes, Invitrogen</i>	Alexa Fluor[®] 546
Burro-α-ratón-IgG	<i>Molecular Probes, Invitrogen</i>	Alexa Fluor [®] 488

Tabla 6. Anticuerpos secundarios α-Histidina.

Anticuerpo	Casa Comercial	Clon	Desarrollado en	Isotipo
α-poli-Histidina-b	<i>R&D Systems</i>	AD1.1.10	Ratón	IgG ₁
α-poli-Histidina-FITC	<i>AbD Serotec</i>	AD1.1.10	Ratón	IgG ₁
α-Histidina-PE	<i>R&D Systems</i>	AD1.1.10	Ratón	IgG ₁

Tampones para RT-PCR**TAE 1x**

- 40 mM Tris-Acetato (*Panreac S.A.*)
- 1,142 mL de Ácido Acético Glacial 99,5% (*Panreac*)
- 1 mM EDTA (pH = 8,0; *MECRK, Alemania*)
- Diluido en H₂O Milli-Q

Tampón de carga

- 20 mL de H₂O destilada
- 20 mL de Glicerol (*Sigma -Aldrich*)
- 0,1 g de Azul de Bromofenol (*Sigma -Aldrich*)
- 0,1 g de Naranja de Acridina (*Sigma -Aldrich*)
- 0,1 g de Cianol Xileno (*Sigma -Aldrich*)

Tampón Salino Fosfato**PBS 1X**

- 8,4 mM Na₂HPO₄ (*Panreac S.A.*)
- 2,6 mM NaH₂PO₄ (*Panreac S.A.*)
- 150 mM NaCl (*Panreac S.A.*)
- Diluido en H₂O Milli-Q
- pH = 7,2 - 7,4

PBS-EDTA-FCS

- 1% suero fetal de ternera (FCS; *Invitrogen*),
- diluido en PBS-EDTA

PBS-FACS

- 2,5 mM EDTA (pH = 8,0; *MECRK*)
- 0,1% de BSA (*Sigma -Aldrich*)
- 0,01% de acida (*Panreac*)
- Diluido en PBS 1X

PBS-EDTA

- 5 mM EDTA (pH = 8,0; *MECRK*)
- Diluido en PBS 1X

PBS-BSA (0,5% de BSA) para inmuno-histoquímicas

- 0,5 % peso/volumen de BSA (*Sigma -Aldrich*)
- Diluido en PBS 1X

PBS-EDTA-TRIPSINA

- Trispsina (*Sigma -Aldrich*) 5 veces diluida
- en PBS - EDTA

Tampón para tinción con Anexina**Tampón -Anexina**

- 10 mM HEPES (pH = 7,4; *Sigma -Aldrich*)
- 140 mM NaCl (*Panreac S.A.*)
- 2,5 mM CaCl₂ (*Panreac S.A.*)
- Diluido en H₂O Milli-Q

Medios de cultivo**PRMI-Completo**

- RPMI 1640 (*Sigma -Aldrich*)
- 10% FCS suero fetal de ternera (*Pelco International, California, Estados Unidos*)
- 1 mM L-Glutamina (*Sigma -Aldrich*)
- 100 µg/mL Estreptomina (*Sigma -Aldrich*)
- 100 U/mL Penicilina (*Sigma -Aldrich*)

PRMI-Experimento

- RPMI 1640 (*Sigma -Aldrich*)
- 1% suero fetal de ternera (FCS; *Invitrogen*)
- 1 mM L-Glutamina (*Sigma -Aldrich*)
- 100 µg/mL Estreptomina (*Sigma -Aldrich*)
- 100 U/mL Penicilina (*Sigma -Aldrich*)

PRMI-Tripsina

- Trispsina (*Sigma -Aldrich*) diluida 5 veces en
- RPMI 1640 (*Sigma -Aldrich*)

Tabla 1. Cebadores para EphA. La localización cromosómica para cada una de las moléculas a amplificar se detalla de cada una de ellas.

Molécula diana	Extremo Cebador	Secuencia Cebadores	Nº de bases	Producto ADNg (bp)	Producto ADNc (bp)
EphA1 7q34	5'	GCCACCATCTGTACCTGTGA	20	659	357
	3'	CTGACACTCCATTTTGGGCT	20		
EphA2 1p36	5'	GAACAACTGAAGCCCCTGAA	20	402	290
	3'	ATGATGTTGTGGTGGCTGAA	20		
EphA3 3p11.2	5'	CCAGCAACATGGATTGTCAG	20	909	1150
	3'	CAAAGTGTGAGGGAGGAAG	20		
EphA4 2q36.1	5'	TGACGCATCCTGCATTAAGA	20	9242	516
	3'	ATAGGAATCTTGCCACCCCT	20		
EphA5 4q13.1	5'	ATCCAATCAAGCTGTCCAC	20	14411	345
	3'	GTGAACTGCCCATCGTTTTT	20		
EphA7 6q16.1	5'	GACCAAGAAGGCGATGAAGA	20	6404	399
	3'	TGCATCTAGGGCTCCATTTT	20		
EphA8 1p36.12	5'	TCCCAGAGCCCCAGTTCTAT	20	475	276
	3'	ATGTTGGGATGGTCAATTG	20		
EphA8 1p36.12	5'	TGCCACTGTGACCTCAGCTA	20	2845	610
	3'	ACACTAGCCTGCCTCTGAGC	20		
EphA10 1p34.3	5'	CCAAGTGTGCCCTGACTACCTGTC	24	990	219
	3'	GTTCAGCCAAAGAGATGCCTAGGCTCAC	28		

Tabla 2. Cebadores para EphB. La localización cromosómica para cada una de las moléculas a amplificar se detalla de cada una de ellas.

Molécula diana	Extremo Cebador	Secuencia Cebadores	Nº de bases	Producto ADNg (bp)	Producto ADNc (bp)
EphB1 3q21-q23	5'	CTTAACATCATTCGCCTGGA	20	66544	1072
	3'	GAGAAATGGAGATTGCCTGC	20		
EphB2 1p36.1-p35	5'	TACAGAGCAGACCTGGACCC	20	1974	290
	3'	GAAGGTGTACTGGGTGTGGG	20		
EphB3 3q21-qter	5'	TGAGTTCATGGAAAAGTGGC	20	707	240
	3'	GTAGGATCGGAGGGGTCATC	20		
EphB4 7q22	5'	GAGAGCTGTGTGGCAATCAA	20	5363	214
	3'	GAACTGTCCGTCGTTAGCC	20		
EphB6 7q33-q35	5'	GATTGAGGAGGTCATTGGGA	20	2514	1022
	3'	GTTGCTGAAGGAGCTGGATG	20		

Tabla 3. Cebadores para EFNA. La localización cromosómica para cada una de las moléculas a amplificar se detalla de cada una de ellas.

Molécula diana	Extremo Cebador	Secuencia Cebadores	Nº de bases	Producto ADNg (bp)	Producto ADNc (bp)
EFNA1 1q21-q22	5'	ACCCAGACCCATAGGAGACC	20	6300	828
	3'	ATACTGACCCGTTTTGAGGC	20		
EFNA2 19p13.3	5'	CTACATCTCTGCCACGCCTC	20	-	300
	3'	GCGTCTCTATTTGGTCTCGG	20		
EFNA3 1q21-q22	5'	ATCTGGATATTTACTGCCCCG	21	1407	544
	3'	CTAGGAGGCCAAGAACGTCA	20		
EFNA4 1q21-q22	5'	GGAAGTCCAGTAACCCCAGG	20	5123	362/528
	3'	ATCTTGGGAGGACTCTGGCT	20		
EFNA5 5q21	5'	CTTCTCGCTCTCTACCCCT	20	289543	872
	3'	TAATGTCAAAAGCATCGCCA	20		

Tabla 4. Cebadores para EFNB. La localización cromosómica para cada una de las moléculas a amplificar se detalla de cada una de ellas.

Molécula diana	Extremo Cebador	Secuencia Cebadores	Nº de bases	Producto ADNg (bp)	Producto ADNc (bp)
EFNB1 Xq12	5'	GGAGAAGAGCGACACCGAAG	20	11048	1213
	3'	CGGGCACTCAGACCTTGTAG	20		
EFNB2 13q33	5'	CATGGCTGTGAGAAGGGACT	20	41981	1059
	3'	AGGCATCGGGACATTAGGTG	20		
EFNB3 17p13.1	5'	CCTTTTGCTGAATTGATCCCT	21	-	1385
	3'	ATTAACTGGAGGAGCACCC	20		

Tabla 5. Otras moléculas de interés. La localización cromosómica para cada una de las moléculas a amplificar se detalla de cada una de ellas.

Molécula diana	Extremo Cebador	Secuencia Cebadores	Nº de bases	Producto ADNg (bp)	Producto ADNc (bp)
β -Actina 7p22	5'	AGAGATGGCCACGGCTGCTT	20	652	445
	3'	ATTTGCGGTGGACGATGGAG	20		
ZAP-70 2q12	5'	CAGCTGGACAACCCCTACAT	20	2521	415
	3'	ACATGGTGACCCCATAGCTC	20		

Tabla 6. Cebadores para Q-RT-PCR. La localización cromosómica para cada una de las moléculas a amplificar se detalla de cada una de ellas.

Molécula diana	Extremo Cebador	Secuencia Cebadores	Nº de bases	Producto ADNc (bp)
EFNa4-L 1q21-q22	5'	CCCTCGGCTTTGAGTTCTTAC	21	137
	3'	CAACAGGATGGGCTGACT	18	
EFNA4-S 1q21-q22	5'	TACTACTACATCTCGGTGCCCACT	24	96
	3'	GGAGGACTCTGGCTCTCCTC	20	
β -Actina 7p22	5'	CTTCCTGGGCATGGAGTC	18	216
	3'	GTACTTGCGCTCAGGAGGAG	20	
ZAP-70 2q12	5'	CAGCTGGACAACCCCTACAT	20	214
	3'	CACGGTGCACAAAGTTCTTC	20	

Anexo V

Tabla 1. Expresión de Eph/EFN de los 82 pacientes evaluados mediante RT-PCR.

MUESTRA B-LLC-SP	EFN		Eph					EFN	Eph				
	A1	A3	A1	A4	A2	A8	A10	B2	B1	B2	B3	B4	B6
1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
2	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
3	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+
4	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+
5	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
7	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
8	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
9	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
10	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
11	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
12	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
13	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
14	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+
15	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
16	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
17	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
18	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
19	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
21	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
22	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+
23	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
24	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
25	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
26	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
27	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
28	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
29	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
30	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
31	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
33	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
34	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
35	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
36	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
37	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
38	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
39	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

MUESTRA B-LLC-SP	EFN		Eph					EFN	Eph				
	A1	A3	A1	A4	A2	A8	A10	B2	B1	B2	B3	B4	B6
42	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
44	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
48	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
49	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
51	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
52	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
53	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
55	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
56	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
57	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
58	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
59	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
61	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
62	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
64	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
65	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
67	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
69	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
70	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
71	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
72	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
74	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
75	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
76	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
77	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
79	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
80	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
81	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
82	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-

Anexo VI



Expression profile of Eph receptors and ephrin ligands in healthy human B lymphocytes and chronic lymphocytic leukemia B-cells

Luis M. Alonso-C^a, Eva M^a. Trinidad^a, Beatriz de Garcillan^a, Monica Ballesteros^b,
Milagros Castellanos^a, Ignacio Cotillo^a, Juan J. Muñoz^a, Agustín G. Zapata^{a,c,*}

^a Centro de Microscopia y Citometría, Universidad Complutense de Madrid (U.C.M.), Madrid, Spain

^b Servicio de Hematología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

^c Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid (U.C.M.), Madrid, Spain

Received 3 June 2008; received in revised form 14 August 2008; accepted 18 August 2008

Abstract

Increasing information relates some Eph receptors and their ligands, ephrins (EFN), with the immune system. Herein, we found that normal B-cells from peripheral blood (PB) and lymph nodes (LN) showed a differential expression of certain Eph/EFN members, some of them being modulated upon *in vitro* stimulation including EFNA1, EFNA4, EphB6 and EphA10. In contrast, PB CLL B-cells showed a more heterogeneous Eph/EFN profile than their normal PB B-cell counterparts, expressing Eph/EFN members frequently found within the LN and activated B-cells, specially EFNA4, EphB6 and EphA10. Two of them, EphB6 and EFNA4 were further related with the clinical course of CLL patients. EphB6 expression correlated with a high content of ZAP-70 mRNA and a poor prognosis. High serum levels of a soluble EFNA4 isoform positively correlated with increasing peripheral blood lymphocyte counts and lymphadenopathy. These findings suggest that Eph/EFN might be relevant in normal B-cell biology and could represent new potential prognostic markers and therapeutic targets for CLL.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Eph receptors; Ephrin; B lymphocyte; CLL; Leukemia

1. Introduction

Eph (erythropoietin producing hepatocellular carcinoma) receptor tyrosine kinases and their membrane bound ligands, the ephrins (EFNs), the largest family of receptor tyrosine kinases, are largely known for their role in coordinating cell movements and positioning mainly in embryonic patterning, axon path-finding and vascular remodelling [1–3]. Eph receptors are type-I transmembrane proteins with an extracellular domain involved in ligand interaction and a cytosolic domain with tyrosine kinase activity. They can be divided into two families, EphA (nine members in humans) and EphB (six members), depending on the similarity within each group

of the extracellular domain sequences and on the affinity for binding either EFNs of type A (five members), which are glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored to the cell membrane, or of type B (three members), which have a single transmembrane domain. With a few exceptions, both Ephs-A and -B promiscuously bind different ligands within their respective class. Their engagement could result in bidirectional signalling, involving both Eph- and EFN-expressing cells, causing either cell-to-cell repulsion or adhesion [4]. Accordingly, Eph/EFNs may act themselves as cell-to-cell adhesion molecules but they can also modulate and be modulated by other cell adhesion molecules [1].

In the last years, there is increasing interest for the role played by Eph/EFNs in the immune system, specially for their effects on T lymphocytes [5–9]. Within the B-cell component of lymphoid system, the Eph/EFN effects are marginally known. EFNA4 is expressed in mature B lymphocytes [10] whereas EphA4 and EphA7 mRNAs are expressed in mature

* Corresponding author at: Dpto. Biología Celular, Faculty of Biology, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria S/N, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 913 94 49 79; fax: +34 913 94 49 81.

E-mail address: zapata@bio.ucm.es (A.G. Zapata).

and immature human B-cells, respectively [11]. On the other hand, deregulated expression of several Eph/EFNs occurs in human cancers in correlation with increased invasiveness, metastatic potential or neoangiogenesis [12–14] and expression of some Eph/EFNs in different B-cell and T-cell leukemia/lymphoma cell lines has also been reported [15–17]. An extensive analysis on their expression and possible involvement in lymphoproliferative disorders is, however, lacking.

We therefore analyzed comparatively the Eph/EFN expression profile in normal human B lymphocytes and in chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells, an heterogeneous lymphoproliferative disorder in terms of clinical course and outcome where better prognostic markers are necessary. A differential expression of certain Eph/EFN members in CLL B-cells, mainly those expressed by activated normal B lymphocytes, was found to be partially correlated with disease outcome.

2. Materials and methods

2.1. Patients and tissue samples

Chronic lymphocytic leukemia cases were diagnosed according to standard morphologic and immunophenotypic criteria. All patients gave written informed consent to be involved in the study, which was approved by the Ethics and Research committees of our Institutions and with the principles of the Helsinki Declaration. According to modified Rai classification into low (Rai 0), intermediate (Rai 1 and 2) and high (Rai 3 and 4) risk categories, the 83 CLL patients examined in the study were distributed, at the moment of blood sampling, as follows: 36 were at low risk; 37 were at intermediate risk; and 10 cases were at high risk. Besides, 54 patients had progressed from diagnosis, 8 patients showed stable disease for more than 3 years and the remaining 21, all of them at low risk at sampling, were recently diagnosed. A progressive disease was considered when patients progressed in stage and/or had a lymphocyte duplication time in less than 12 months and/or required treatment due to the appearance of disease-related symptoms.

B-cells, either from healthy donors or CLL patients, were enriched from peripheral blood samples first by density centrifugation of blood onto Histopaque 1.077 cushion (SIGMA, Spain). Next, most T-cells were depleted by rosetting with AET treated sheep erythrocytes and the obtained negative fraction was further depleted of monocytes (CD14+), residual T and NK cells (CD2+) and granulocytes (CD13+) by pre-incubating the cells with the corresponding monoclonal antibodies (Ab) for the indicated antigens (BD-Pharmingen), followed by secondary species specific antibodies conjugated to MACS (Miltenyi Biotech, Germany) and final depletion passing the cell suspensions through an AutoMACS cell separator (Miltenyi Biotech, Germany). The enriched leukemic population was then isolated through a final step of positive selection with an anti-CD5 Ab plus MACS conjugated appropriate secondary antibodies. By this way, the final CLL cell preparations were mainly CD19+CD5+ cells.

A similar protocol was conducted to isolate B-cells from lymph node samples, which were always small fragments from benign reactive lymph nodes.

2.2. Cultures

B-cell cultures were carried out in RPMI-1640 medium containing 10% foetal calf serum, 1 mM sodium pyruvate, 1 mM L-Gln with or without goat anti-human IgM F(Ab)₂ fragments (0.5 µg/mL) (Jackson ImmunoResearch, UK) or lipopolysaccharide (LPS, 1 µg/mL, SIGMA).

2.3. Western blot

Sera from CLL or healthy donors were first depleted of most human serum albumin (HSA) (SwellGel, Pierce). Then, 20–40 µg total protein from the resulting HSA depleted sera were run under reducing conditions in routine SDS-PAGE, blotted onto PVDF membranes (Immobilon-P membranes, Millipore) and incubated with a biotinylated anti-human EFNA4 Ab (R&D) followed by an streptavidin-horse radish peroxidase conjugate (SAV-HRPO) and chemiluminescence reagent (ECL Plus reagent, Amersham). X-ray films (Kodak) were exposed for different times. The exposed films were finally digitalized with an HP scanner.

2.4. Flow cytometry analysis

Cell surface immunostainings were carried out by incubating the cell suspensions with Abs in cold PBS, containing 0.1% bovine serum albumin (BSA) and sodium azide, at a final concentration of 2×10^5 cells per 50 µL of this buffer solution. Firstly, cell suspensions were incubated with Fc fragments of human IgG Igs, then with an anti-EphB6 polyclonal Ab followed by incubation with AlexaFluor-488 conjugated anti-goat IgG secondary Ab. When biotinylated forms of the anti-EphB6 or -EFNA4 polyclonal Ab were employed, the cell suspensions were pre-incubated with Fc fragments of human IgGs as well as with purified goat IgGs, then the biotinylated antigen specific Abs followed by SAV-Alexa fluor 488. Finally, anti-CD5 and -CD19 monoclonal Ab, conjugated to PE or APC, respectively, were added to the cell suspensions in the presence of purified mouse IgGs. Data were acquired in a FACScalibur flow cytometer (BD) and analyzed with CellQuest software (BD).

Abs used was fluorochrome conjugated anti-CD19, anti-CD5, anti-CD3, anti-CD23 or anti-CD10 (all from BD). Anti-EFNA4 or anti-EphB6 polyclonal Abs were from R&D, which were biotinylated by us with sulfo-NHS-biotin from Pierce. Second step reagents were SAV-Alexa fluor 488 (Invitrogen), SAV-APC (BD) or anti-goat Alexa fluor 488 (Fab'2 fragments of donkey IgGs preadsorbed with human and mouse Igs, from Invitrogen). Purified mouse, human (Fc fragments) and goat IgGs were from Jackson-ImmunoResearch.

2.5. ELISA immunoassays

Indirect ELISAs were carried out in order to quantify EFNA4 in serum. An anti-human EFNA4 goat polyclonal antiserum (R&D), capable of recognising different epitopes within the same molecule, was used for both capture and detection of serum EFNA4 protein. For capture, the antiserum was used unconjugated while a biotinylated form was used for detection. To detect the bound biotinylated antiserum, we used an SAV-HRPO conjugate (Jackson-ImmunoResearch). Serum samples were serially diluted twofold to eightfold before addition to ELISA plates. Recombinant human EFNA4 (R&D) was employed as a standard and as a positive control. One hundred microliter of each fourfold serial dilutions of the stan-

dard were tested, starting from 1.00 µg/mL, up to eight dilutions. Plates (MaxiSorp Nunc-Immunoplates, Nunc) were read at 405 nm (reference wavelength 492 nm) on a microplate reader (Bio-Tek Instruments). Standard curves were generated in order to determine the content of EFNA4 in serum (ng/ml).

2.6. RNA isolation and RT-PCR procedures

Total RNA was isolated from 1 × 10⁷ cells lysed in 1 mL Tri-Reagent (SIGMA). cDNA synthesis was carried out with 5 µg total RNA per 20 µL final volume reactions (Superscript III, Invitrogen). For all samples, cDNA quality was checked through PCR amplification of human β-actin.

PCR amplifications were carried out with an AmpliTaq Gold polymerase (Invitrogen). Primer pairs for PCR amplifications were as follows:

- EphA1 (FW-GCCACCATCTGTACCTGTGA; RV-CTGACA-CTCCATTTTGGGCT);
- EphA2 (FW-GAACAAGTGAAGCCCCTGAA; RV-ATGATG-TTGTGGTGGCTGAA);
- EphA3 (FW-CCAGCAACATGGATTGTCAG; RV-CAAAGTGTGAGGGAGGAAG);
- EphA4 (FW-TGACGCATCCTGCATTAAGA; RV-ATAGGAA-TCTTGCCACCCCT);
- EphA5 (FW-ATCCCAATCAAGCTGTCCAC; RV-GTGAAGT-GCCCATCGTTTTT);
- EphA7 (FW-GACCAAGAAGGCGATGAAGA; RV-TGCATC-TAGGGCTCCATTTT);
- EphA8 (FW-TCCCAGAGCCCCAGTTCTAT; RV-ATGTTGG-GATGGTTCGAATTG);
- EphA10 (FW-CCAAGTGTGCCCTGACTACCTGTC; RV-GT-TCAGCCAAAGAGATGCCTAGGCTCAC);
- EphB1 (FW-CTTAACATCATTCGCCTGGA; RV-GAGAAAT-GGAGATTGCCTGC);
- EphB2 (FW-TACAGAGCAGACCTGGACCC; RV-GAAGGT-GTACTGGGTGTGGG);
- EphB3 (FW-TGAGTTCATGGAAAAGTGC; RV-GTAGGAT-CGGAGGGGTCATC);
- EphB4 (FW-GAGAGCTGTGTGGCAATCAA; RV-GAAC-TGTCCTCGTTTAGCC);
- EphB6 (FW-GATTGAGGAGGTCATTGGGA; RV-GTTGCT-GAAGGAGCTGGATG);
- EFNA1 (FW-ACCCAGACCCATAGGAGACC; RV-ATACTG-ACCCGTTTGTAGGC);
- EFNA2 (FW-CTACATCTCTGCCACGCCTC; RV-GCGTCT-CTATTTGGTCTCGG);
- EFNA3 (FW-ATCTGGATATTTACTGCCCCG; RV-CTAGGA-GGCCAAGAACGTCA);
- EFNA4 (FW-GGAATCCAGTAACCCAGG; RV-ATCTTG-GGAGGACTCTGGCT);
- EFNA5 (FW-CTTCTCGCTCTCCTACCCCT; RV-TAATGT-CAAAAGCATCGCCA);
- EFN1 (FW-GGAGAAGAGCGACACCGAAG; RV-CGG-GCACTCAGACCTTGATG);
- EFN2 (FW-CATGGCTGTGAGAAGGGACT; RV-AGGCAT-CGGGACATTAGGTG);
- EFN3 (FW-CTTTTGTCTGAATTGATCCCT; RV-ATTAA-ACTGGAGGAGACCC);
- β-Actin (FW-AGAGATGGCCACGGCTGCTT; RV-ATTTGC-GGTGGACGATGGAG);

- ZAP-70 (FW-CAGCTGGACAACCCCTACAT; RV-ACATGG-TGACCCCATAGCTC).

A semiquantitative PCR was developed to determine positive and negative samples, through employing varying amounts of cDNA per PCR reaction and sample, normalizing to β-actin amplification. The PCR amplification conditions were 93 °C for 5 min initial step followed by 40 cycles of 94 °C for 15 s, 58 °C for 30 s and 72 °C for 30 s followed by 10 min at 72 °C for final extension. PCR products were separated in 1.5% agarose gels, stained with EtBr and imaged with a GelDoc UV-illuminator (BioRad). Gels analyses were carried out with Quantity-One software (BioRad).

2.7. Cloning and nucleotide sequencing

EFNA4 PCR products were cloned onto plasmids for bacterial transformation using the TOPO-TA cloning kit (Invitrogen). Nucleotide sequencing was carried out with AbiPrism-3730 (Applied Biosystems).

2.8. Quantitative real-time PCR (Q-PCR)

Primers for human EFNA4, ZAP-70 and β-actin quantification by Q-PCR were as follows: EFNA4 L (FW-CCCTCGGCTTTGAGTTCTTAC; RV-CAACAGGATGGGCTG-ACT); EFNA4 S (FW-TACTACTACATCTCGGTGCCCACT; RV-GGAGGACTCTGGCTCTCCTC); ZAP-70 (FW-CAGCTGGA-CAACCCCTACAT; RV-CACGGTGCACAAAGTTCTTC); β-Actin (FW-CTTCTCGGTCATGGAGTC; RV-GTACTTGGCGCTC-AGGAGGAG).

EFNA4 mRNA splice variants 1 and 2, corresponding to EFNA4L and EFNA4S isoforms, respectively, were quantified according to Vandenbroucke et al. [18] by employing discriminating primer pairs in order to obtain a single PCR product in each case (Fig. 1B). SyBR-Green PCR Mastermix (Applied Biosystems) was employed to develop Q-PCR in an AbiPrism-7700 machine (Applied Biosystems). Melting curves were generated after amplification. Ct values were determined with AbiPrism software (Applied Biosystems). ΔCt values (the difference between the Ct value of a given target gene and that of a housekeeping gene, Ct_{gene} – Ct_{housekeeping}) were compared between samples, considering that this measure is inversely related to transcript abundance. The abundance of each EFNA4 mRNA in the CLL samples was also expressed as x-fold changes relative to normal PB B-cells as the calibrator (Comparative 2^{-ΔΔCt} method, Applied Biosystems). β-Actin amplification was used for normalization.

2.9. Statistical analyses

Mean values were compared for quantitative data by two-sample, two-tailed Student's *t*-test. The association between expression of each Eph/EFN member and clinical parameters was analyzed by Chi-square (χ²) test with Fisher's exact correction. Simple regression tools were employed to determine correlations between continuous variables. SPSS 15.0 for windows was used for statistical analyses.

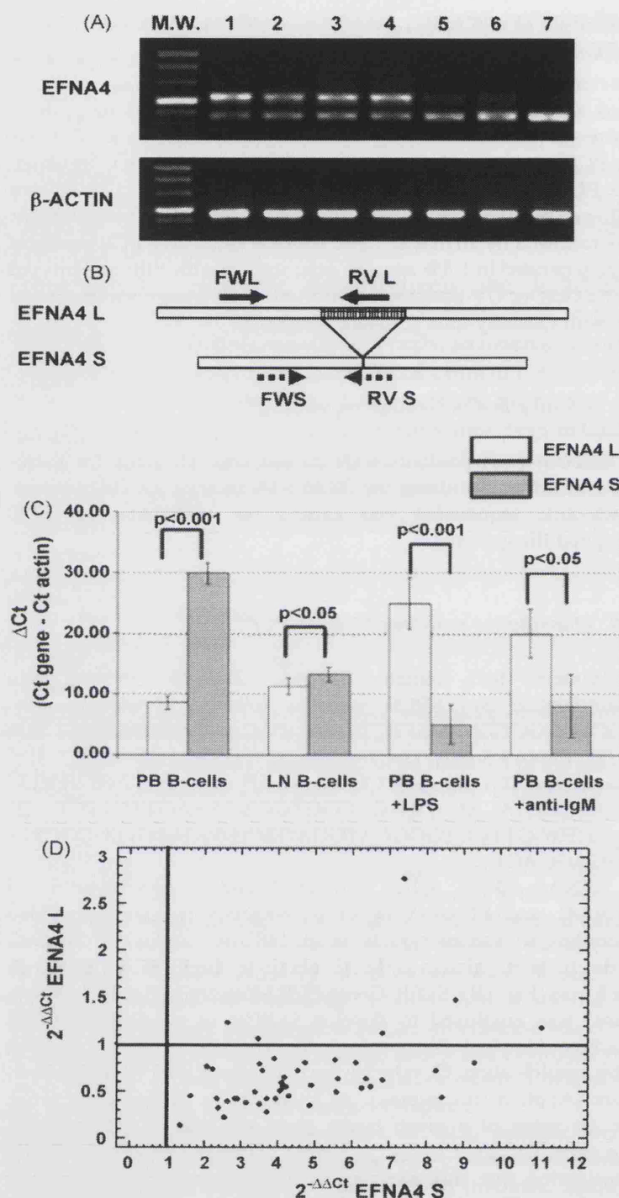


Fig. 1. Normal human B-cells and CLL B-cells contain variable amounts of two mRNA isoforms for EFNA4. (A) Two differentially sized EFNA4 PCR products (563 and 397 bp long, upper and lower band, respectively) were obtained from human B-cells which were designated EFNA4 L (long product) and EFNA4 S (short product) [1–2: PB; 3–4: LN; 5–6: cultured PB B-cells (5, no treatment; 6, anti-IgM); 7: CLL B-cells]. (B) Q-PCR design used for discriminating both EFNA4 mRNA spliced variants (FW, forward primer; RV, reversal primer). (C) Comparison of EFNA4 mRNA isoforms content in different B-cell preparations. Note that ΔC_t values (Ct gene – Ct β -actin) are an inverse measure of mRNA content. Fresh PB B-cells contained significantly more EFNA4L than EFNA4S while *in vitro* anti-IgM or LPS treatments led to an inverse situation, inducing a dramatic increase in EFNA4S. By contrast, LN B-cells contained slightly similar amounts of both EFNA4 isoforms. (D) The abundance of each EFNA4 transcript in PB CLL B-cell samples was determined through Q-PCR and expressed as x-fold amounts ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) compared to normal PB B-cells as the calibrator

3. Results

3.1. Normal human B-cells isolated from PB or LN differed in the Eph/EFNs expressed

As determined by semi-quantitative RT-PCR, freshly isolated healthy human B-cells from PB (six samples) or LNs (four samples), expressed EFNA4 and EphA4 in all analyzed samples but were negative for EFNA2, EFNA5, EphA7, EFNB1, EFNB3 and EphB3 (Table 1). In addition, both populations expressed in common, although at different frequencies, EphA1, EphA2 and EphA3 (Table 1 while EphA8, EphB2 and EphB4 were only detected in the PB B-cells and EFNA1, EFNA3, EphA5, EphA10, EFNB2, EphB1 and EphB6 were only observed in the LN B-cells (Table 1). These results suggested a differentially regulated expression in the two healthy B-cell populations.

Two differentially sized PCR products were obtained for EFNA4 (Fig. 1A). As determined by nucleotide sequencing of the cloned products, the longest PCR product corresponded to EFNA4 transcript variant 1 (GenBank access NM_005227.2), thereafter referred to as the long isoform (EFNA4-L) that encodes for a membrane bound protein. The shortest product corresponded to EFNA4 transcript variant 2 (GenBank access NM_182689.1), thereafter referred to as the short isoform (EFNA4-S), presumably coding for a soluble isoform. We further determined, by Q-PCR, that both B-cell populations differed in the relative content of each EFNA4 isoform (Fig. 1C). Thus, the PB B-cells contained more EFNA4-L than -S while LN B-cells contained similar amounts of both (Fig. 1C).

3.2. Different Eph/EFN expression pattern could be partially related to the activation state of healthy B-cells

Because Eph/EFNs are involved in lymphocyte activation [10,19,20], we analyzed whether the Eph/EFN expression profile observed in the studied normal B-cell populations could be related to their activation state. In order to test this, PB B-cells were cultured for 3 days alone or either with an anti-IgM antibody or LPS, a BCR-dependent and a BCR-independent stimulus, respectively. In the absence of stimuli, cultured PB B-cells lost the expression of most Eph/EFNs, except EphA4 and EFNA4 and did not up-regulate others (Table 1). Both treatments induced the expression of EFNA1, EFNB2, EphA10 and EphB6 in the PB B-cells, all of which were normally expressed by the LN B-cells (Table 1). Interestingly, EphA8, expressed by fresh PB B-cells but not by LN B-cells, was lost in any tested condition. Furthermore,

(value = 1.0, reference values for normal human B-cells are indicated by the cross-line intercept) (comparative ΔC_t method, Applied Biosystems). Most PB CLL B-cell samples (>95%) were contained within the lower-right quadrant indicating that they express less EFNA4L and more EFNA4S than normal PB B-cells.

Table 1
Eph/EFN expression in normal human B-cells and CLL B-cells as determined by RT-PCR

	Fresh B-cells		Cultured PB B-cells			CLL B-cells
	PB (total N=6)	LN (total N=4)	N.S. (total N=6)	Anti-IgM (total N=6)	LPS (total N=6)	(Total N=83)
	No. positive (%)	No. positive (%)	No. positive (%)	No. positive (%)	No. positive (%)	No. positive (%)
EFNA1	–	4 (100)	–	6 (100)	6 (100)	15 (18.07)
EFNA2	–	–	–	–	–	–
EFNA3	–	2 (50)	–	–	–	22 (26.51)
EFNA4	6 (100)	4 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	83 (100)
EFNA5	–	–	–	–	–	–
EphA1	1 (16.67)	3 (75)	–	6 (100)	–	12 (14.46)
EphA2	1 (16.67)	1 (25)	–	6 (100)	–	30 (36.14)
EphA3	1 (16.67)	4 (100)	–	–	–	–
EphA4	6 (100)	4 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	33 (39.76)
EphA5	–	3 (75)	–	–	–	–
EphA7	–	–	–	–	–	–
EphA8	6 (100)	–	–	–	–	23 (27.71)
EphA10	–	4 (100)	–	6 (100)	6 (100)	56 (67.47)
EFNB1	–	–	–	–	–	–
EFNB2	–	2 (50)	–	6 (100)	6 (100)	10 (12.05)
EFNB3	–	–	–	–	–	–
EphB1	–	2 (50)	–	–	–	16 (19.28)
EphB2	6 (100)	–	–	–	6 (100)	7 (8.43)
EphB3	–	–	–	6 (100)	–	8 (9.64)
EphB4	6 (100)	–	–	–	6 (100)	3 (3.61)
EphB6	–	4 (100)	–	6 (100)	6 (100)	39 (46.99)

–, no expressing cases; PB: peripheral blood; LN: lymph nodes; N/S: non-stimulated.

both stimuli dramatically increased the content of EFNA4S isoform relative to EFNA4L, as determined by Q-PCR (Fig. 1C). Other Eph/EFNs were differentially modulated by the stimuli employed. LPS, but not anti-IgM, treatment sustained the expression of EphB2 and EphB4 in the cultured PB B-cells (Table 1). By contrast, anti-IgM treatment was able of inducing EphA1, EphA2 and EphB3 expression (Table 1).

3.3. Eph/EFN expression in PB CLL B-cells

PB CLL B-cells, as normal B-cells, did not express EFNA2, EFNA5 or EphA7, but showed a more heterogeneous pattern of expression than the normal B-cells (Table 1). Only EFNA4 was present in all samples (Table 1), containing more EFNA4S and less EFNA4L than the normal PB B-cells (Fig. 1D), like LN or activated B-cells. In line with this, the most frequently expressed Eph/EFNs in PB CLL B-cells were EphA10 (68%) and EphB6 (48%), both mainly expressed by LN and activated B-cells, while only 28% cases expressed EphA8 (Table 1), largely associated to normal PB B-cells. Thus, considering the expression of those Eph/EFN expressed by the *in vitro* activated B-cells, most CLL samples (80 out of 83) exhibited an activated phenotype.

3.4. Eph/EFN expression and clinical features

CLL is an heterogeneous leukemia in terms of clinical outcome. Thus, we explored the possible relationships

between Eph/EFN expression and CLL clinical outcomes according to ZAP-70 content, disease progression, Rai stages, lymphocytosis and occurrence of lymphadenopathy (Table 2a).

The occurrence of lymphadenopathy in CLL patients was inversely associated with the expression of EFNA1 ($P < 0.05$, Table 2a) and, to a lesser extent with EFN A3 or Eph B1, in the PB CLL B-cells. In addition, all CLL cases presenting lymphadenopathy contained significantly more EFNA4-S than in others ($P < 0.001$, Table 2b) while EFNA4 L levels slightly differed between both clinical situations (Table 2b).

According to the modified Rai stage of patients, it was found a trend of association between EFNA1, EFNA3 or EphB1 expressions with low risk stages (Table 2a) and of EphA4 with low and intermediate risks (Table 2a). A significantly higher content of EFNA4S was found in intermediate modified Rai stages than in low ($P < 0.001$, Table 2b) or high stages ($P < 0.001$, Table 2b) while EFNA4L levels were significantly higher in the low stages (Table 2b).

EphB6 expression was highly associated with the disease progression (Table 2a). Thus, all EphB6 expressing cases, within the 62 considered for this analysis, showed a progressive disease (Table 2a).

On the other hand, increased ZAP-70 expression in CLL patients is a surrogate molecular marker for poor prognosis of the disease [21,22]. We quantified by Q-PCR the ZAP-70 mRNA content of the CLL B-cells relative to normal PB B-cells. The ZAP-70 content was significantly higher in those CLL cases showing progression of the disease or in those

Table 2a

Analysis of Eph/EFN expression of CLL patients in relation with their clinical characteristics

	Lymphadenopathy ^a			Modified Rai stage ^a				Disease outcome ^a			ZAP-70 (mRNA content) ^b		PBL count ($\times 10^9/L$) ^b	
	No	Yes	P value	LO	INT	HI	P value	SD	PD	P value	Mean (std. err.)	P value	Mean (std. err.)	P value
EFNA1														
+	11	4		10	4	1		1	8		12.45 (3.56)		41.19 (12.44)	
–	28	40	0.043	26	33	9	0.05	7	46	NS	8.95 (1.12)	NS	47.50 (6.06)	NS
EFNA3														
+	13	9		12	7	3		1	12		10.99 (2.45)		60.97 (14.34)	
–	26	35	NS	24	30	7	NS	7	42	NS	9.05 (1.24)	NS	42.76 (5.74)	NS
EPHA1														
+	6	6		5	7	0		2	8		5.37 (1.26)		28.58 (6.65)	
–	33	38	NS	31	30	10	NS	6	46	NS	10.24 (1.26)	0.012	50.04 (6.29)	0.026
EPHA2														
+	17	13		16	10	4		3	18		10.15 (1.71)		39.77 (9.13)	
–	22	31	NS	20	27	6	NS	5	36	NS	9.28 (1.53)	NS	49.15 (6.71)	NS
EPHA4														
+	20	13		18	11	4		1	20		11.38 (1.98)		55.79 (10.42)	
–	19	31	NS	18	26	6	NS	7	34	NS	8.51 (1.35)	NS	40.76 (5.94)	NS
EPHA8														
+	11	12		10	10	3		0	16		12.92 (2.29)		43.53 (8.01)	
–	28	32	NS	26	27	7	NS	8	38	NS	8.21 (1.24)	NS	48.03 (7.16)	NS
EPHA10														
+	26	30		25	25	6		5	36		9.98 (1.44)		49.80 (6.94)	
–	12	14	NS	10	12	4	NS	3	18	NS	8.79 (1.72)	NS	41.48 (8.94)	NS
EFNB2														
+	4	6		4	4	2		0	8		10.37 (3.92)		80.44 (17.45)	
–	35	38	NS	32	33	8	NS	8	46	NS	9.54 (1.18)	NS	40.07 (5.20)	0.006
EPHB1														
+	11	5		11	4	1		2	9		11.50 (2.64)		30.74 (14.40)	
–	28	39	NS	25	33	9	0.048	6	45	NS	8.96 (1.22)	NS	48.93 (5.88)	NS
EPHB2														
+	4	3		4	3	0		0	7		20.35 (5.13)		38.27 (16.04)	
–	35	41	NS	32	34	10	NS	8	47	NS	8.82 (1.09)	0.008	47.64 (5.85)	NS
EPHB3														
+	4	4		4	4	0		1	5		9.69 (2.86)		49.27 (15.73)	
–	35	40	NS	32	33	10	NS	7	49	NS	9.64 (1.22)	NS	46.24 (5.87)	NS
EPHB6														
+	17	22		16	18	5		0	28		13.66 (1.86)		61.98 (10.33)	
–	22	22	NS	20	19	5	NS	8	26	0.006	5.89 (0.91)	0.001	35.45 (5.11)	0.027

SD, stable disease; PD, progressive disease; NS, not significant ($P > 0.05$).^a χ^2 tests with Fisher's exact correction.^b Two-tailed Student's *t*-test.

patients who had needed treatment (Fig. 2) which was in agreement with the prognostic significance of ZAP-70 in this leukemia. With regard to the Eph/EFN expression, a higher ZAP-70 content was found in EphB2 ($P < 0.05$, Table 2a) and, specially, EphB6 ($P < 0.001$, Table 2a) expressing CLL cases while other significant correlations could not be established.

Finally, Eph A1 expression was related with the lowest lymphocytosis while EFNB2 and EphB6 expressions were significantly associated with the highest lymphocytosis (Table 2a). By contrast, EFNA4 mRNA levels did not significantly correlate with this clinical feature (Table 2b).

3.5. Analysis of the expression of EphB6 and EFNA4 proteins

The above described results demonstrated a close relationship between Eph B6 and EFN A4 with CLL disease; the former one with ZAP-70 and a poor prognosis of the disease, and the later with the occurrence of malignant lymphadenopathy. We then tried to validate the expression of EphB6 and EFNA4 at the protein level as possible tools to monitor CLL prognosis.

As determined by flow cytometry, EphB6 was absent from normal PB B-cells (6 cases analyzed) and from Eph B6 mRNA negative CLL samples (12 cases exam-

Table 2b
EFNA4 mRNA isoforms content of CLL patients and their clinical characteristics

	Lymphadenopathy		Modified Rai stage				Disease outcome			ZAP-70		PBL count	
	No	Yes	P value	LO	INT	HI	P value*	SD	PD	P value	P value	P value	P value

EFNA4-L 0.67 (0.17) 0.54 (0.17) 0.029 0.69 (0.04) 0.54 (0.04) 0.41 (0.04) <0.001 0.74 (0.07) 0.53 (0.03) NS NS NS

EFNA4-S 4.06 (1.62) 8.02 (4.33) <0.001 4.14 (0.38) 7.60 (0.85) 6.27 (1.27) <0.001 4.43 (0.53) 6.81 (0.66) NS NS NS

EFNA4-L and EFNA4-S mRNA content were determined by Q-PCR and expressed as x-fold change relative to normal human PB B-cells.

* Significant differences were seen between high (HI) and low (LO) risk stages in the case of EFNA4-L, and between intermediate (INT) and low risk in the case of EFNA4-S. NS, not significant (P > 0.05)

correlation.

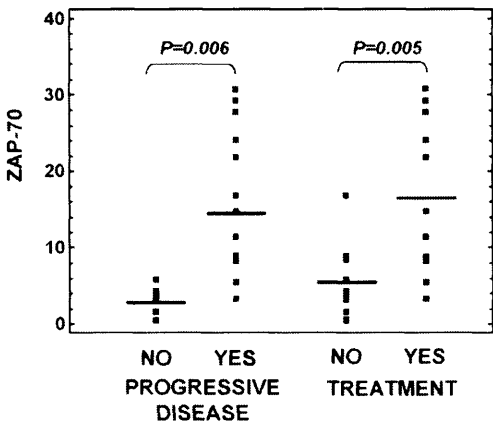


Fig. 2. The ZAP-70 mRNA content of CLL patients was significantly higher in those who had progressive disease or had received treatment. Q-PCR was used to determine the amount of ZAP-70 mRNA in CLL B-cells samples and expressed as x-fold changes relative to normal PB B-cells. Mean ZAP-70 values were compared between groups according to the occurrence of disease progression or received treatment of patients (two-tailed Student's *t*-test).

ined) (Fig. 3A). By contrast, all Eph B6 mRNA positive CLL cases (10 cases examined) showed Eph B6 expression, as evaluated by flow cytometry (Fig. 3A). In accordance with the observed PCR expression, healthy human PB B-cells expressed EphB6 on their surface after stimulation with either anti-IgM (Fig. 3B) or LPS (not shown).

On the other hand, we determined by flow cytometry that healthy B-cells, either from PB or LN, weakly expressed EFNA4 as compared to CLL B-cells (16 patients examined) which showed higher but differential levels of expression (Fig. 4A). In this regard, a lower expression of EFNA4 occurred in int/hi risk CLL samples than in those from low risk patients (Fig. 4A). We further determined that anti-IgM (Fig. 4B) or LPS (not shown) *in vitro* stimulated normal human PB B-cells increased the surface expression of EFNA4.

Furthermore, Western blot analysis revealed the presence of a differential band of approximately 30 kDa in the sera from CLL patients that was not present in those from healthy controls (Fig. 4C). The amount of EFNA4 protein detected in serum by ELISA highly correlated with the lymphocytosis of CLL patients (Fig. 4D), reaching concentrations, in the most extreme case, up to 3.00 ng/ml in a patient with 200×10^6 lymphocytes/ml peripheral blood. Furthermore, a significant higher content of EFNA4 protein was found in sera from patients with lymphadenopathy (Fig. 4E).

Thus, both flow cytometry analysis of either EphB6 or EFNA4 expression or determination of EFNA4 content in the sera from CLL patients could be valuable tools for disease prognosis.

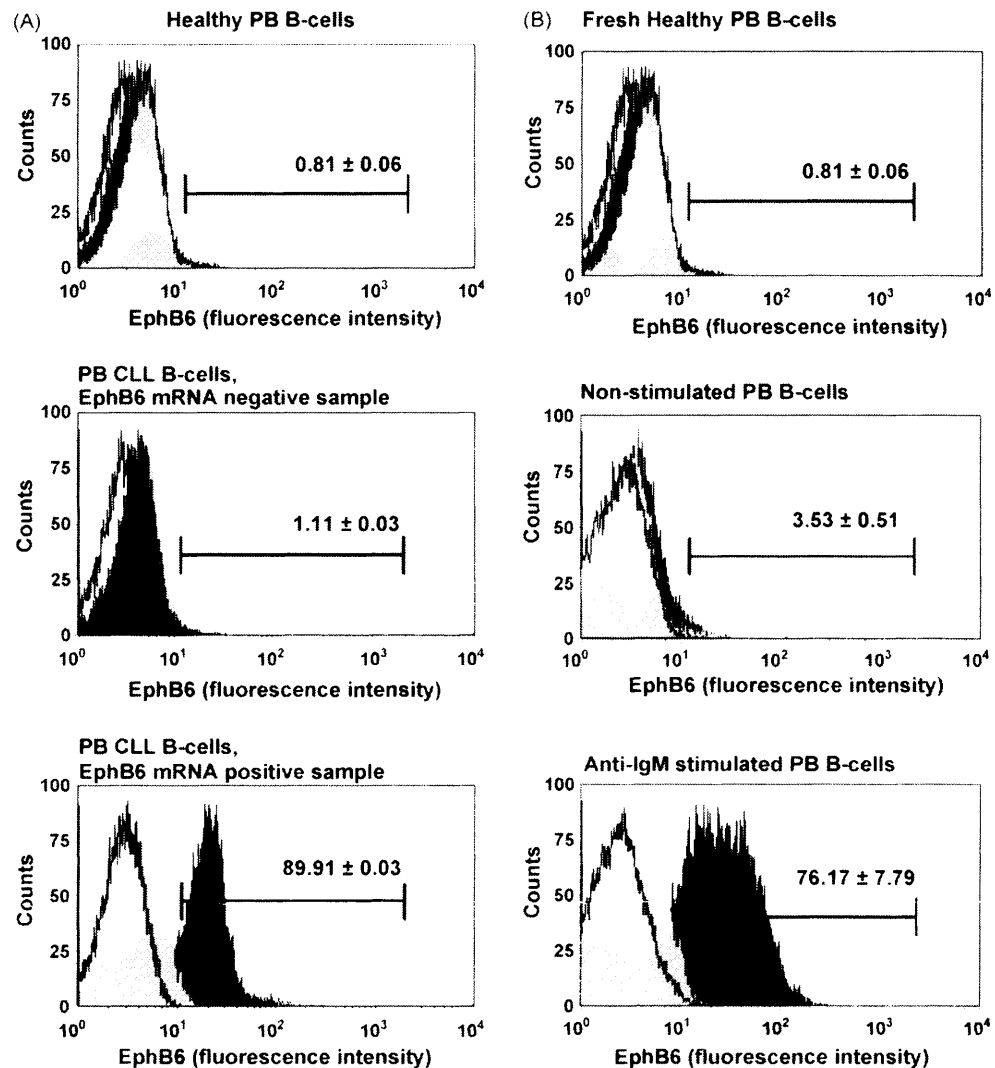


Fig. 3. CLL B-cell samples show a differential expression of EphB6 which can be determined by flow cytometry analysis. (A) PB samples from healthy subjects (upper panel) or CLL patients (middle and lower panels) were triple stained for flow cytometry analysis with anti-EphB6, CD19 and CD5 Ab. All data shown are representative control or EphB6 staining results within gated CD19+ (healthy PB) or CD19 and CD5 double positive cell populations (CLL PB samples). (Empty histograms: control secondary Ab staining in Fc only incubated cells; grey histograms: control background staining in Fc plus goat IgG incubated cells stained with secondary Ab; black histograms: anti-EphB6 staining). EphB6 staining was mainly observed in CLL samples containing EphB6 transcripts (lower panel) but not in non-containing CLL (middle) or healthy B-cell samples (upper) (numbers within plots are percentage of EphB6 expressing cells over control goat IgG stainings (marker line), expressed as mean \pm standard errors from at least three independent experiments). (B) Isolated B-cells (>95% CD19+ purity) from the PB of healthy subjects were cultured for 72 h with or without anti-IgM or LPS stimuli. As determined by flow cytometry, anti-IgM (lower panel) or LPS (not-shown) stimulated B-cells expressed EphB6 on a majority of cells, compared to fresh (upper panel) or cultured non-stimulated (middle) B-cells. All data shown are representative control or EphB6 staining results within gated CD19+ population (empty histograms: control SAV-Alexa 488 staining in Fc plus goat IgG incubated cells; grey histograms: control background staining in Fc plus goat IgG incubated cells stained with anti-goat Alexa 488 secondary Ab; black histograms: biotinylated anti-EphB6 staining).

4. Discussion

Owing to increasing evidence for the differential expression of some Eph/ephrins in human cancers and tumour cell lines [12–14] we opted to analyze them in CLL B-cells and their possible correlation with disease stages and prognosis. We have profiled, therefore, Eph/EFNs mRNA expression in normal human B-cells from two different origins, peripheral blood and lymph nodes, either fresh or *in vitro* stimulated, as well as in PB B-cells from CLL patients.

Previous work had demonstrated a constitutive expression of EphA4 during normal human B-cell lymphopoiesis and in mature stages whereas EphA7 receptor was expressed only during immature stages [11]. Besides, EFNA4 was shown to be expressed by human B-cells as two mRNA variants [10]. Our results confirm the absence of EphA7 expression in human mature B-cells as well as the constitutive expression of both EFN4 and EphA4 in all studied normal B-cell populations. However, as for EFNA4 variants expressed by B-cells, we only detected the transcript variants 1 and 2,

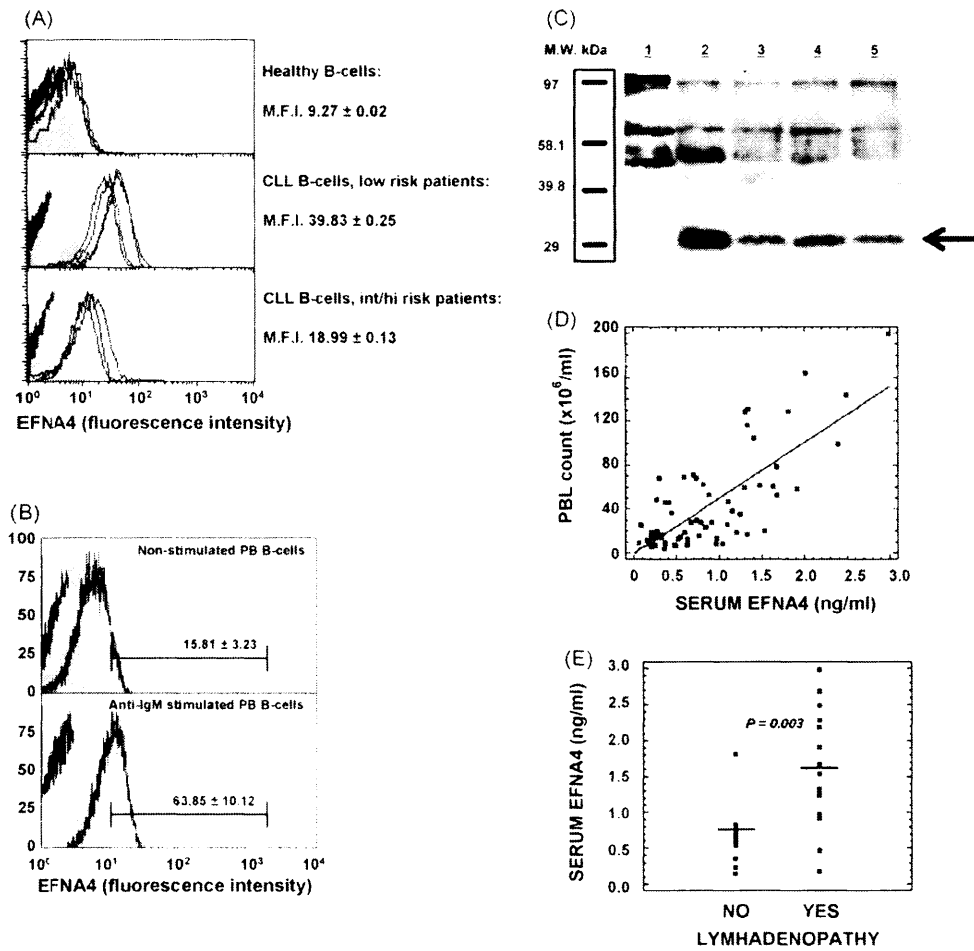


Fig. 4. CLL patients show increased expression of EFNA4 in the cell surface of B-cells and accumulate a soluble EFNA4 isoform in sera. (A) Flow cytometry analysis of EFNA4 expression in human B-cells. B-cells were isolated from PB of healthy subjects or CLL patients and surface stained with a biotinylated anti-EFNA4 Ab followed by incubation with AlexaFluor-488 conjugated streptavidin (SAV-Alexa 488). EFNA4 positive staining was observed in all B-cell samples analyzed although higher expression levels were found in those from CLL patients at low risk Rai stage (M.F.I.: mean fluorescence intensity (mean ± standard error)). Representative data are shown. (Black histograms: control SAV-488 staining; grey histograms: control background staining in human Fc plus goat IgG incubated cells stained with anti-goat Alexa 488 secondary Ab; empty histograms: EFNA4 staining.) (B) Isolated B-cells (>95% CD19+ purity) from the PB of healthy subjects were cultured for 72 h with or without anti-IgM or LPS stimuli. After culture, an increase in the percentage of EFNA4 expressing population was observed in the anti-IgM (lower panel) or LPS (not-shown) stimulated B-cells compared to non-stimulated control cultures (upper panel). All data shown are representative control or EFNA4 staining results within gated CD19+ population. (Black histograms: control SAV-Alexa 488 staining in Fc plus goat IgG incubated cells; grey histograms: control background staining in human Fc plus goat IgG incubated cells stained with anti-goat Alexa 488 secondary Ab; empty histograms: anti-EFNA4 staining.) (C) Sera from healthy subjects (lane 1) or CLL patients (lanes 2–5) were separated by SDS–PAGE under reducing conditions. An Ab against human EFNA4 revealed the presence of a differential band (arrow) in the sera from CLL patients not present in those from healthy donors. (D and E): quantification of EFNA4 in the serum from CLL patients was achieved by ELISA immunoassays. The concentration of EFNA4 in the serum of CLL patients positively correlated with peripheral blood lymphocyte counts (D) (Spearman's correlation coefficient = 0.75; $P < 0.01$) and the occurrence of lymphadenopathy (E) (two-tailed Student's t -test).

corresponding to the here named long (L) and short (S) isoforms, which are produced at different levels depending on the activation state of the B-cells, but not transcript variant 3 [10]. Remarkably, the expression of other Eph/EFNs is differentially modulated in mature B-cells from PB or LNs. EFNA1, EFNA3, EphA5, EphA10, EFNB2, EphB1 and EphB6 are characteristic of LN B lymphocytes whereas EphA8, EphB2 and EphB4 are expressed in PB B-cells. In addition, PB B-cells, but not LN B lymphocytes express more EFNA4L than EFNA4S. This differential pattern of expression between both normal B lymphocyte populations might be related to their different activation stages and, presum-

ably, their different tissue locations. The Eph/EFN expression profile observed in LN B lymphocytes can be partially reproduced after *in vitro* activation of the PB B-cells, specially as for EFNA1, EphA10, EFNB2, EphB2, EphB4 and EphB6 whereas EFNA2, EFNA3, EFNA5, EphA3, EphA5, EphA8, EFNB1, EFNB3 or EphB1 were not expressed in any of the *in vitro* conditions tested.

On the other hand, when we compared the Eph/EFN profile between *in vivo* and *in vitro* stimulated B-cells and those of CLL, we evidenced a differential expression pattern in the leukemia cells which presumably reflects their own heterogeneity [23,24], but highly correlated with an activated

B-cell profile. It is interesting to remark the high frequency of EphA10 and EphB6 expression in CLL cases. Both are present in the normal B-cell population only from LN and can be induced after *in vitro* stimulation of PB B-cells. On the contrary, only 28% of leukemic samples expressed EphA8, frequently expressed in PB B-cells. EphA10 and EphB6 receptors lack essential aminoacid residues in the highly conserved consensus motifs in the kinase domain compared with other Eph receptors which, in the case of EphB6, results in an inactive receptor kinase (pseudokinase) while this is only predicted in the case of EphA10 [1]. EphA10 is a recently described Eph receptor in humans [25] and there is not previous work on its functional roles. By contrast, EphB6 has been only associated with T lymphocytes [26], in which it seems to be involved in cell signalling [8,19,20,27]. Thus, although not previously described in B lymphocytes, this molecule could be also involved in B-cell activation and, as it will be later discussed, Eph B6 emerges from the current results as a good molecular marker for CLL prognosis. Other studies have comparatively profiled the overall gene expression signature of normal B-cell populations and CLL cells [28–31] but, to our knowledge, no study has yet reported a differential expression of Eph/EFN between them. On the other hand, only EphA3, EphB4 and EFNB2 have been reported to be expressed in human B-cell leukemia/lymphoma cell lines [15] and pre-B ALL cell lines [32].

Furthermore, our study demonstrates that the observed Eph/EFN expression profile in the analyzed CLL samples could be correlated with certain features of the disease. Thus, EFNA1 and Eph B1 were mainly expressed during the earliest, low risk stages of disease, whereas EFNB2 and EphB6 were mainly related with poor disease outcomes. By contrast, EphA1 showed a trend of correlation with a better prognosis as EphA1 positive CLL cases contained a lower ZAP-70 and lymphocytosis than EphA1 negative ones. Thus, the Eph/EFN expression profile of circulating CLL B-cells could contribute to tumour burden and dissemination, as pointed out for this family of molecules in other human tumours [12–14].

Further, Eph B6 and EFNA4 emerge from our results as candidate molecular markers for CLL prognosis. EphB6 is already expressed from the earliest, low risk, Rai stages of CLL cases exhibiting the highest ZAP-70 content. An up-regulated expression of ZAP-70 highly correlates with the occurrence of unmutated IgVh genes in CLL cases and poorest prognosis [21,22] being currently considered as a surrogate molecular marker of poor prognosis. Our results are in accordance with this assumption. When EphB6 expression was examined, its presence also highly correlated with severe progression groups and severe lymphocytosis. Furthermore, EphB6 expressing cases constituted a distinct group of patients containing the highest ZAP-70 content, both markers highly correlating, therefore, between them as well as with poor prognosis. On the other hand, EphB6 expression can easily be detected by flow cytometry on the cell surface of CLL B-cells, which could facilitate the routine clinical

diagnosis of the most severe cases of CLL, as compared to the detection of ZAP-70 or the analysis of IgVh mutations. On the other hand, its absence in normal peripheral blood B-cells allows an easy discrimination between healthy and leukemia B-cells.

EFNA4 could also play an important role in the biology of CLL, as it is over-expressed in these leukemia B-cells and, accordingly, could be also used as another tool for disease prognosis. Thus, there is an important correlation between changes in the relative levels of both EFNA4 mRNA variants within CLL samples and occurrence of lymphadenopathy as well as between the levels of serum EFNA4 of CLL patients with or without lymphadenopathy or increasing lymphocytosis. In any case, serum EFNA4 levels were always higher in CLL patients than in healthy donors, reinforcing that an increase in serum EFNA4 could be an early indicator of CLL. Besides, differential levels of EFNA4 expression on the surface of CLL B-cells can be determined by flow cytometry discriminating low from int/hi risk stages.

The presence of splice variants in some members of Eph/EFN families is relatively frequent [25,33,34] suggesting that soluble isoforms could represent a regulatory mechanism of Eph/EFN interactions, as signalling might occur only when receptor/ligands are clustered onto the cell membrane [1]. In the case of CLL, as well as in normal B-cells, the equilibrium between EFNA4 isoforms could play a similar role by interfering in the interaction of the membrane bound EFNA molecules with their Eph receptors thus blocking bidirectional communications with other regulatory cells within the tissue which, in the case of CLL, could contribute to the biology of the disease. Recently, EFNA4 has been shown to inhibit sensory neurite outgrowth within the developing mouse skin [35], suggesting that this molecule could participate in cell repulsion rather than cell attraction. Thus, owing to our present observations, EFNA4-mediated repulsion could contribute to lymphocytosis. In fact, our own preliminary results show that the observed over-expression of EFNA4 in CLL cells could play a major role in the poor migration of leukemia cells through an endothelium, in their adhesion to different extracellular matrix molecules and even in their survival [Oral presentation at the 16th European Congress of Immunology, 2006; manuscript in preparation].

In summary, we have shown an altered Eph/EFN gene expression profile in the peripheral blood B-cells from CLL patients compared to those from healthy donors which is reminiscent, in general, of that observed in LN B-cells and recently activated B-cells. Furthermore, several molecules, mainly EphB6 and EFNA4 but also others like EFNA1, EphA1 and EFNB2, as the most significant ones, emerge from these results as possible new molecular markers for CLL prognosis. Finally, further work will be necessary in order to clarify the possible contribution of these molecules, mainly EphB6 and EFNA4 in CLL, including its possible role in the overall dysfunction of the immune system in these patients.

Conflict of interest

The authors reported no potential conflicts of interest.

Acknowledgments

LM A-C, performed conception and design of the study, experiments, data analysis and interpretation, manuscript writing; EMT, performed experiments and contributed to data analysis and interpretation; BG, MC, IC and JJM performed experiments; MB, provided patient samples and clinical data, and contributed to interpretation of data; AGZ, performed conception and design of the study, data analysis and interpretation, manuscript writing.

All authors critically reviewed and approved the final version of the manuscript.

This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Health (FIS-PI050591) and the Spanish Ministry of Science (BFU2004-03/32). E. Trinidad was supported by the Spanish Ministry of Health (FIS-PI050591) and B. Garcillan was from Red de Terapia Celular-TerCel (FIS RD06/0010/0003).

Contributions. We thank patients for contributing to this research. We also thank Dr. A. Orfao for critical review of this manuscript; Dr. E. Roldan for kindly supply of some of the CLL samples; Dr. F. Vivanco for suggestions with Western blot and Drs. P. Cardas and J. Zuloaga for supply of lymph node biopsies. Real-time PCR and nucleotide sequencing were carried out in the Centre of Genomics (Campus Moncloa) of the Scientific Park of Madrid.

References

- [1] Pasquale EB. Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:462–75.
- [2] Poliakov A, Cotrina M, Wilkinson DG. Diverse roles of Eph receptors and ephrins in the regulation of cell migration and tissue assembly. *Dev Cell* 2004;7:465–80.
- [3] Klein R. Eph/ephrin signaling in morphogenesis, neural development and plasticity. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16:580–9.
- [4] Himanen JP, Nikolov DB. Eph signaling: a structural view. *Trends Neurosci* 2003;26:46–51.
- [5] Munoz JJ, Alfaro D, Garcia-Ceca J, Alonso CL, Jimenez E, Zapata A. Thymic alterations in EphA4-deficient mice. *J Immunol* 2006;177:804–13.
- [6] Munoz JJ, Alonso CL, Sacedon R, Crompton T, Vicente A, Jimenez E, et al. Expression and function of the Eph A receptors and their ligands ephrins A in the rat thymus. *J Immunol* 2002;169:177–84.
- [7] Aasheim HC, Delabie J, Finne EF. Ephrin-A1 binding to CD4+ T lymphocytes stimulates migration and induces tyrosine phosphorylation of PYK2. *Blood* 2005;105:2869–76.
- [8] Luo H, Yu G, Tremblay J, Wu J. EphB6-null mutation results in compromised T cell function. *J Clin Invest* 2004;114:1762–73.
- [9] Sharfe N, Freywald A, Toro A, Dadi H, Roifman C. Ephrin stimulation modulates T cell chemotaxis. *Eur J Immunol* 2002;32:3745–55.
- [10] Aasheim HC, Munthe E, Funderud S, Smeland EB, Beiske K, Logtenberg T. A splice variant of human ephrin-A4 encodes a soluble molecule that is secreted by activated human B lymphocytes. *Blood* 2000;95:221–30.
- [11] Aasheim HC, Terstappen LW, Logtenberg T. Regulated expression of the Eph-related receptor tyrosine kinase Hek11 in early human B lymphopoiesis. *Blood* 1997;90:3613–22.
- [12] Brantley-Sieders D, Schmidt S, Parker M, Chen J. Eph receptor tyrosine kinases in tumor and tumor microenvironment. *Curr Pharm Des* 2004;10:3431–42.
- [13] Hafner C, Bataille F, Meyer S, Becker B, Roesch A, Landthaler M, et al. Loss of EphB6 expression in metastatic melanoma. *Int J Oncol* 2003;23:1553–9.
- [14] Wimmer-Kleikamp SH, Lackmann M. Eph-modulated cell morphology, adhesion and motility in carcinogenesis. *IUBMB Life* 2005;57:421–31.
- [15] Steube KG, Meyer C, Habig S, Uphoff CC, Drexler HG. Expression of receptor tyrosine kinase HTK (hepatoma transmembrane kinase) and HTK ligand by human leukemia-lymphoma cell lines. *Leuk Lymphoma* 1999;33:371–6.
- [16] Inada T, Iwama A, Sakano S, Ohno M, Sawada K, Suda T. Selective expression of the receptor tyrosine kinase, HTK, on human erythroid progenitor cells. *Blood* 1997;89:2757–65.
- [17] Wicks IP, Wilkinson D, Salvaris E, Boyd AW. Molecular cloning of HEK, the gene encoding a receptor tyrosine kinase expressed by human lymphoid tumor cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:1611–5.
- [18] Vandenbroucke II, Vandesompele J, Paepe AD, Messiaen L. Quantification of splice variants using real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:E68–78.
- [19] Freywald A, Sharfe N, Rashotte C, Grunberger T, Roifman CM. The EphB6 receptor inhibits JNK activation in T lymphocytes and modulates T cell receptor-mediated responses. *J Biol Chem* 2003;278:10150–6.
- [20] Luo H, Yu G, Wu Y, Wu J. EphB6 crosslinking results in costimulation of T cells. *J Clin Invest* 2002;110:1141–50.
- [21] Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Lancet* 2004;363:105–11.
- [22] Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrikson SE, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003;101:4944–51.
- [23] D'Arena G, Di Renzo N, Brugiattelli M, Vigliotti ML, Keating MJ. Biological and clinical heterogeneity of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2003;44:223–8.
- [24] Hamblin L. Chronic lymphocytic leukemia: one disease or two? *Ann Hematol* 2002;81:299–303.
- [25] Aasheim HC, Patzke S, Hjorthaug HS, Finne EF. Characterization of a novel Eph receptor tyrosine kinase, EphA10, expressed in testis. *Biochim Biophys Acta* 2005;1723:1–7.
- [26] Shimoyama M, Matsuoka H, Tamekane A, Ito M, Iwata N, Inoue R, et al. T-cell-specific expression of kinase-defective Eph-family receptor protein, EphB6 in normal as well as transformed hematopoietic cells. *Growth Factors* 2000;18:63–78.
- [27] Luo H, Wan X, Wu Y, Wu J. Cross-linking of EphB6 resulting in signal transduction and apoptosis in Jurkat cells. *J Immunol* 2001;167:1362–70.
- [28] Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Fais F, Yan XJ, et al. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood* 2002;99:4087–93.
- [29] Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 2001;194:1625–38.
- [30] Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001;194:1639–47.

- [31] Huttmann A, Klein-Hitpass L, Thomale J, Deenen R, Carpinteiro A, Nuckel H, et al. Gene expression signatures separate B-cell chronic lymphocytic leukemia prognostic subgroups defined by ZAP-70 and CD38 expression status. *Leukemia* 2006;20:1774–82.
- [32] Boyd AW, Ward LD, Wicks IP, Simpson RJ, Salvaris E, Wilks A, et al. Isolation and characterization of a novel receptor-type protein tyrosine kinase (hek) from a human pre-B cell line. *J Biol Chem* 1992;267:3262–7.
- [33] Holmberg J, Clarke DL, Frisen J. Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor. *Nature* 2000;408:203–6.
- [34] Lai KO, Ip FC, Ip NY. Identification and characterization of splice variants of ephrin-A3 and ephrin-A5. *FEBS Lett* 1999;458:265–9.
- [35] Moss A, Alvares D, Meredith-Middleton J, Robinson M, Slater R, Hunt SP, et al. Ephrin-A4 inhibits sensory neurite outgrowth and is regulated by neonatal skin wounding. *Eur J Neurosci* 2005;22:2413–21.

Anexo VII

An impaired transendothelial migration potential of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells can be linked to ephrin-A4 expression

Eva M. Trinidad,¹ Mónica Ballesteros,² Jaime Zuloaga,³ Agustín Zapata,⁴ and Luis M. Alonso-Colmenar¹

¹Microscopy and Cytometry Research Centre, Complutense University of Madrid, Madrid; ²Department of Hematology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid; ³Surgical Service, Hospital Clínico San Carlos, Madrid; and ⁴Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) cell migration into lymphoid tissues is an important aspect of the pathobiology of this disease. Here, we investigated the role of ephrin-A4 (EFNA4) in the transendothelial migration (TEM) capacity of CLL and normal B cells through interacting with endothelial EphA2 (erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma). CLL cells showed a remarkable impairment in the adhesion to and transmigration through human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) monolayers, correlating

with their higher EFNA4 expression. In vitro, TEM was mediated by EFNA4 binding to endothelial EphA2 receptor, which is highly expressed in tumor necrosis factor- α -activated HUVECs as well as in the CD31⁺ endothelial cells of human lymph nodes. The pretreatment of CLL cells with EphA2 homodimers further impaired their adhesion to and transmigration through HUVEC monolayers, whereas pretreatment of HUVECs with EFNA4 homodimers improved those phenomena in both CLL and normal B cells, suggesting that EFNA4 signaling

negatively contributed to TEM. In fact, EFNA4 signaling into CLL cells significantly reduced their adhesion to intercellular adhesion molecule 1, vascular cell adhesion molecule 1, and several extracellular matrix molecules and impaired CCL-19-mediated TEM and chemotaxis. Our results suggest that EFNA4-EphA2 interactions are involved in CLL cell trafficking between blood and the tissues and therefore may become a therapeutic target in the future. (Blood. 2009;114:5081-5090)

Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by the progressive accumulation of CD5⁺ leukemia B cells in the peripheral blood (PB), bone marrow, and lymphoid tissues.^{1,2} CLL cells continuously traffic between these tissue compartments and form proliferation centers or “pseudofollicles” within the infiltrated lymphoid tissues, likely contributing to tumor growth and survival,^{3,4} but these issues are still controversial and not fully clear. Thus, a central aspect of the pathophysiology of CLL is the knowledge of the mechanism/s governing CLL-cell extravasation into lymphoid tissues because interfering with this process might be beneficial for disease management. The study in CLL cells of the common molecular mechanisms of lymphocyte entry into lymph nodes (LNs), including chemokine receptors like CCR7, CXCR4, or CXCR5 or cell-adhesion molecules (CAMs) of the integrin family,⁵⁻⁹ has revealed, but not conclusively demonstrated, partial associations between the expression of some of these molecules and a differential migration capacity that could be associated to the occurrence of clinical lymphadenopathy.^{5,6,8} Finally, several lines of evidence have suggested that CLL cells could have an altered capacity to migrate into the different tissue compartments.¹⁰⁻¹³ Hence, further work is necessary to unravel the mechanisms of CLL-cell extravasation into tissues through the definition of new molecular players.¹⁴

CLL cells differentially express some members of the Eph receptor tyrosine kinase family, partially correlating with clinical features.¹⁵ An inverse association between the expression levels of

ephrin-A4 (EFNA4) and the presence of clinical lymphadenopathy was found,¹⁵ suggesting that EFNA4 could play a functional role in the extravasation capacity of CLL cells.

Eph receptor tyrosine kinases and their membrane-bound ligands, the ephrins (EFNs), are largely known for their role in regulating cell shape and attachment through the modulation of cell adhesion and migration.¹⁶⁻²² They are classified into 2 families, EphA (9 members in humans) and EphB (6 members), depending on the similarity within each group of the extracellular domain sequences and on their affinity for binding EFNs either of type A (5 members), which are glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins to the cell membrane, or of type B (3 members), which have a single transmembrane domain.¹⁶⁻¹⁹

An essential property of Eph-EFN interaction is that it can result in bidirectional signaling into both the Eph- (forward signaling) and the EFN-expressing cells (reverse signaling).^{16-19,23,24} The degree of Eph/EFN aggregation during interaction may affect signal strength, leading to opposed cell outcomes, such as adhesion or repulsion between the interacting cells,^{16-19,23} through modulating and being modulated by other adhesion molecules, including integrins.¹⁷

On the basis of these data, we investigated the role played by EFNA4 in the CLL-cell traffic through tissues. We examined whether EFNA4 mediates the adhesion and/or transendothelial migration (TEM) of CLL cells to endothelial cells, thus modulating their capacity for extravasation.

Submitted March 12, 2009; accepted September 20, 2009. Prepublished online as Blood First Edition paper, October 14, 2009; DOI 10.1182/blood-2009-03-210617.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked “advertisement” in accordance with 18 USC section 1734.

© 2009 by The American Society of Hematology

Methods

Human samples

All patients with CLL provided written informed consent to their involvement in the study, which was approved by the Ethics and Research Committees of our participating institutions in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. Patients were untreated and diagnosed according to standard morphologic and immunophenotypic criteria (supplemental Table 1, available on the *Blood* website; see the Supplemental Materials link at the top of the online article).

Heparinized blood samples were centrifuged onto Histopaque 1.077 cushion (Sigma-Aldrich) to obtain PB mononuclear cells and were then depleted of most T cells by rosetting with 2-amino-ethyl-thio-isourea bromide hydrobromide (Sigma-Aldrich)-treated sheep erythrocytes (Durviz). Monocytes (CD14⁺), residual T and natural killer cells (CD2⁺), and granulocytes (CD13⁺) were depleted by preincubating the cell suspensions with monoclonal antibodies (mAbs) for the indicated antigens (BD Biosciences), followed by secondary species-specific Abs conjugated to MACS (Miltenyi Biotec) and separated through an AutoMACS cell separator (Miltenyi Biotec). The purities of CLL or normal B-cell enrichments were 98% or greater.

To isolate CD31-expressing endothelial cells from LNs, cell suspensions were prepared through mechanical disruption followed by collagenase digestion (Collagenase Type IV, Invitrogen; 400 U/mL, at 37°C, 1 hour) of fresh LN biopsies (4 CLL lymphadenopathies, 2 reactive LN and 2 normal sentinel LN from patients with breast cancer). T cells were depleted as discussed previously and CD5-, CD19-, CD13-, or CD14-expressing cells through magnetic beads (Dynabeads; Invitrogen). Finally, a positive selection step of CD31-expressing cells was performed with an anti-human CD31 mAb (BD Biosciences) and MACS-coupled secondary Abs (Miltenyi Biotec).

Reverse transcription–polymerase chain reaction analysis of Eph receptor mRNA expression

Total RNA was isolated from cell lysates (Tri-Reagent; Sigma-Aldrich) following the manufacturer's instructions. A total of 2 µg of total RNA was reverse-transcribed into cDNA (Superscript III; Invitrogen). Polymerase chain reaction (PCR) amplifications were performed with an AmpliTaq Gold polymerase (Invitrogen) in a PCR thermal cycler (Eppendorf; see the supplemental Methods section for primers).

After PCR amplification (5 minutes at 93°C initial step, followed by 40 cycles of 15 seconds at 94°C, 30 seconds at 58°C, and 30 seconds at 72°C, followed by 10 minutes at 72°C for final extension), PCR products were analyzed on a 1.2% agarose gel (Biotools) containing ethidium bromide (Sigma-Aldrich) and imaged with a GelDoc UV illuminator (Bio-Rad).

Flow cytometric analyses

Cell suspensions were incubated in cold phosphate-buffered saline (PBS; 0.1% bovine serum albumin [BSA], 2 × 10⁵ cells/50 µL) with the following mAbs: anti-CD19 (fluorescein isothiocyanate [FITC], allophycocyanin, or phycoerythrin [PE]), -CD5 (PECy5), -CD3 (PECy5 or APC); FITC-labeled anti-CD10, -CD11a, -CD44, -CD54; PE-labeled anti-CD23, -CD29, -CCR7; PE-Cy5-labeled anti-CD18, -CD49d; and Alexa Fluor 647-labeled anti-CD31 (all from BD Biosciences). EFNA4 expression was determined with a biotinylated goat anti-human EFNA4 polyclonal Ab (Vitro; R&D Systems) in the presence of purified goat IgG immunoglobulins (Jackson ImmunoResearch Laboratories) followed by streptavidin–Alexa Fluor 488 (Invitrogen). Intracellular anti-EphA2 stainings (goat anti-human EphA2; Santa Cruz Biotechnology) were carried out in permeabilized (Cytofix/Cytoperm buffer; BD Biosciences) human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) suspensions, followed by PE-coupled anti-goat secondary Abs (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Eph/EFN binding assays were done by preincubating cell suspensions with purified human IgG Fc fragments (hFc; Jackson ImmunoResearch Laboratories) before the addition of Eph/EFN homodimeric proteins (0.5 µg/10⁶ cells; R&D Systems),

followed by a FITC (AbD Serotec) or PE-labeled anti-His mouse mAb (R&D Systems). Data were acquired in a 4-color flow cytometer (FACS-Calibur; BD Biosciences) and analyzed with CellQuest software (BD Biosciences).

TEM assays

HUVECs (PromoCell; LabClinics) were grown to confluent monolayer in endothelial-cell culture medium (PromoCell) onto 96-well culture plates (BD Biosciences), overnight activated with 10 ng/mL tumor necrosis factor-α (TNF-α) (PeproTech) in serum-starved medium, and washed in fresh medium for 2 hours. B cells were stained with 2 µM carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE; Invitrogen), added to wells (3 × 10⁵/well), and cocultured for 2 hours. Then, wells were gently and thoroughly washed with warmed medium, thus recovering both nonadhered and weakly adhered B cells (Fraction-1, F-1). A second round of washings with warmed medium containing 5 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid; Panreac) allowed tightly adhered B cells to be recovered (F-2). Finally, the HUVEC monolayers were detached by treating them with medium containing trypsin/5 mM EDTA, thus releasing B cells from beneath the monolayer (F-3). Examination of the plate under the microscope was routinely performed before and after the final washing step to control the integrity and complete detachment, respectively, of the HUVEC monolayer. Absolute B-cell counts were determined by flow cytometry, through gating of CFSE-positive lymphocytes, and counting beads (CountBright absolute counting beads; Invitrogen) following the manufacturer's recommendations, according to the formula:

$$(\text{Number of B-cell events/number of bead events}) \times \text{number of beads added}$$

HUVEC-lymphocyte conjugates

TNF-α-activated HUVEC monolayers were stained with PKH-26 fluorescent dye (Sigma-Aldrich). Then, HUVECs were detached by washing with culture medium containing 5 mM EDTA. Each sample tube consisted of PKH-26-stained HUVECs (5 × 10⁴) mixed with CFSE (2 µM)-stained B cells (2 × 10⁵), spun down and cocultured at 37°C. At the indicated times, cell suspensions were fixed (Cell-fix solution; BD Biosciences) and analyzed by FACS (supplemental Figure 1).

Cell-adhesion assays

Extracellular matrix molecules (ECM) including fibronectin (FN, 10 µg/mL), vitronectin (VN, 10 µg/mL), laminin (10 µg/mL), type I collagen (10 µg/mL; all from BD Biosciences) and hyaluronic acid (10 µg/mL), or recombinant CAMs intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1; 10 µg/mL each, all from R&D Systems) were bound to the flat surface of 96-well culture plates (BD Biosciences) for 2 hours at 37°C. CLL and normal B cells (5 × 10⁵/well, 200 µL final volume) were allowed to adhere for 2 hours. Nonadhered cells were then recovered through agitation and aspiration and counted by FACS (see "TEM assays").

Chemotaxis assays

Chemotaxis assays were performed in Transwell insert plates (96-well, 5-µm pore size filters; Costar, Corning), with or without a HUVEC monolayer grown onto them. CFSE-stained B cells were added to the upper chamber (5 × 10⁵/well) in the presence of human recombinant chemokines (PeproTech) in the lower chamber (CCL19, 500 ng/mL; CXCL12, 100 ng/mL; CXCL13, 1000 ng/mL). Plates were centrifuged (for 5 seconds at 200g) to spin down the cells onto the filter and migration proceeded for 2 hours in the incubator (37°C, 5% CO₂). Migrated cells were recovered from the bottom chamber through washing with 5 mM EDTA containing medium to detach cells and counted by FACS (see the section "TEM assays").

Confocal microscopy studies

Fluorescence images were acquired in a confocal microscope (TCS-SP2 AOBs spectral detection system coupled to an IRE-2 Leica inverted

Table 1. EFNA4, cell adhesion molecules, and CCR7 expressions of CLL cells in relation to clinical stage and lymphadenopathy

Case no.	Stage (Rai)*	Lymphadenopathy	EFNA4	CD62L	CD44	CD11a (LFA1 α)	CD18 (β 2)	CD49d (VLA-4 α)	CD29 (β 1)	CCR7
CLL-1	Lo	No	37.23	89.44	166.23	7.64	10.63	13.91	8.26	4.07
CLL-2	Lo	No	32.58	18.96	144.93	14.98	15.46	45.06	14.01	6.73
CLL-3	Lo	No	52.36	48.81	113.39	36.41	35.25	20.62	15.81	6.35
CLL-4	Lo	No	65.56	121.52	929.44	14.62	22.73	29.89	11.60	39.23
CLL-5	Int	Yes	14.95	859.23	1376.01	24.48	79.77	133.06	15.40	24.31
CLL-6	Int	Yes	15.23	181.91	924.52	11.40	40.72	123.45	17.84	12.56
CLL-7	Int	Yes	19.98	583.33	741.23	32.12	74.90	20.33	12.39	15.23
CLL-8	Int	Yes	23.75	706.02	939.25	13.86	16.51	29.63	18.24	14.75
CLL-9	Hi	Yes	25.56	562.23	725.23	10.67	9.83	20.25	13.27	11.70
CLL-10	Hi	Yes	12.65	868.62	441.25	10.87	9.08	22.52	14.01	10.76
CLL-11	Hi	Yes	35.62	444.02	333.25	13.58	10.32	12.48	18.84	8.97
CLL-12	Hi	No	36.26	649.23	689.52	19.05	11.11	7.08	25.02	10.11
CLL-13	Hi	No	25.63	1740.21	1140.32	14.97	9.10	7.20	55.85	12.25

Numbers are mean fluorescence intensity (MFI) values as determined by flow cytometry. EFNA4 (MFI) of normal B cells: 8.04 ± 0.23 (mean \pm SEM from 3 different samples).

CLL indicates chronic lymphocytic leukemia.

*Clinical stage of untreated CLL patients (modified Rai staging) at the moment of blood sampling: low (Lo, Rai 0), intermediate (Int, Rai I-II) and high risk (Hi, Rai III-IV).

microscope, Leica). Sequential acquisition scanning was carried out by line-averaging ($\times 8$) and frame accumulation ($\times 2$) at 1024×1024 pixel resolution, in a 22°C cooled darkroom. Where indicated, Z-series

confocal images ($0.1\text{-}\mu\text{m}$ Z-steps) were obtained from apical to basal sides of HUVECs. Colocalization plots and pseudocolor projections of z-stacks were created with LCS software (Leica). Quantification of

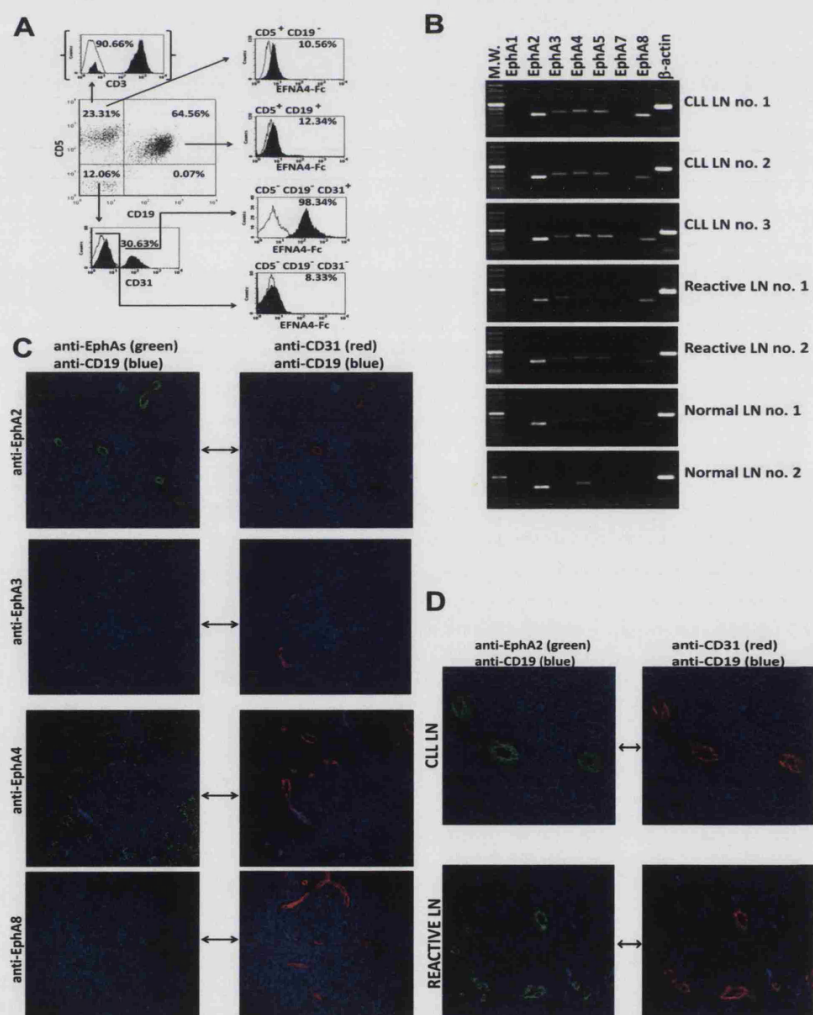


Figure 1. EphA2 is the main EFNA4 receptor found in the CD31⁺ vascular endothelium of human LN. (A) Flow cytometric analyses of EFNA4-Fc binding by LN cells from patients with CLL (a representative experiment is shown, CLL LN no. 2). Cell suspensions (3×10^5 /sample tube) from fresh CLL LN biopsies were preincubated with hFc before the addition of poly-His-tagged EFNA4-Fc homodimers ($0.5 \mu\text{g}/10^6$ cells), then followed by an anti His-FITC mAb. The percentage of EFNA4-Fc binding cells (black profiles) was analyzed within gated subpopulations according to CD5, CD19, and CD31 costainings (empty profiles: control anti-His-FITC stainings). (B) RT-PCR analyses of EphA mRNAs expression of enriched CD2⁺ CD5⁺ CD19⁺ CD13⁺ CD14⁺ CD31⁺ LN cells from CLL patients or control subjects ($\geq 95\%$ purity, 2.5×10^5 cells per LN fragment). (C-D) Immunofluorescence analysis of EphA receptor expression on LN tissue sections. LN cryosections ($8 \mu\text{m}$ thick) were immunostained for detection of EphA2, EphA3, EphA4, or EphA8 (Alexa Fluor 546, green), CD31 (Alexa Fluor 647, red), and CD19 (Alexa Fluor 488, blue). Objectives: $20\times$ multi-immersion, 1.20 NA. (D) High magnification images (objective: $63\times$ oil immersion, 1.40 NA) of CLL or normal LN showing expression of EphA2 (green) in the high endothelial venules (CD31⁺ structures, red; CLL LN no. 2 in panels C-D; Normal reactive LN in panel D). Fluorescence images were acquired with a confocal microscope (Leica TCS-SP2 AOBs).

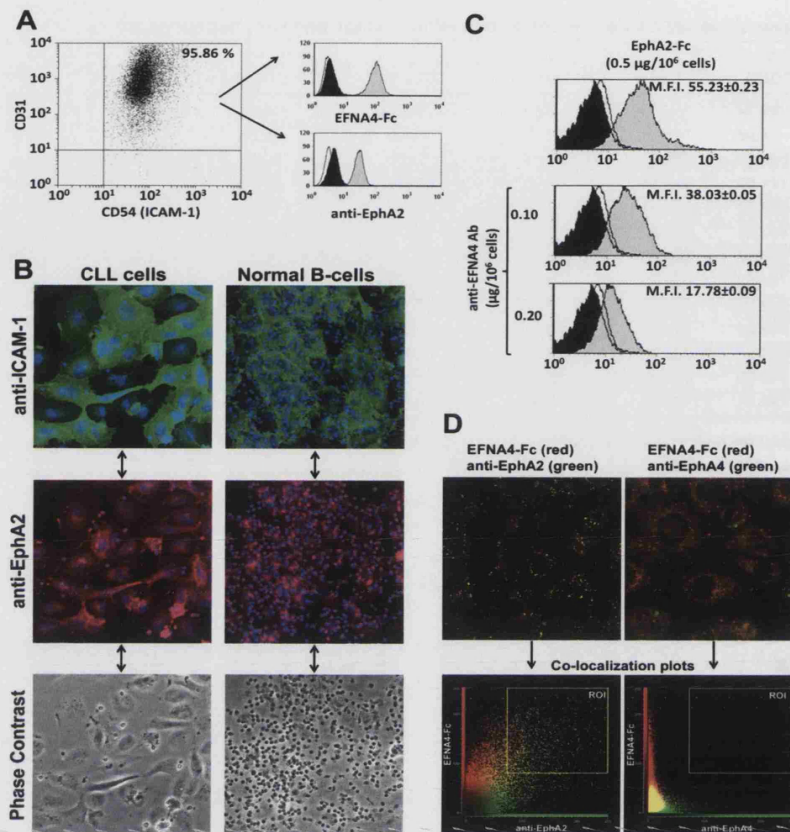


Figure 2. EphA2-EFNA4 interactions can take place in the adhesion between HUVECs and B cells during TEM. (A) Flow cytometry analysis of EFNA4-Fc binding (top histogram, gray) or EphA2 expression (bottom histogram, gray) of TNF- α -activated HUVECs (>95% CD31, CD54 double positive, dot-plot; black histogram: control secondary PE-Abs; white: unstained cells). (B) CLL cells or normal B cells were cocultured for 2 hours with TNF- α -activated HUVEC monolayers, the nonadherent cells were washed out, and slides were fixed and immunostained for EphA2 (Alexa Fluor 546, red, bottom) and ICAM-1 (Alexa Fluor 488, green, top; blue, Hoechst 33342 counterstained cell nuclei); confocal microscope: Leica TCS-SP2 AOBS; objectives: 20 \times oil-immersion, 1.20 NA. Note the high number of normal B cells transigrated (dark appearance) compared with cultures containing CLL cells in the phase-contrast images. (C) Flow cytometric analyses of EphA2-Fc binding by CLL cells directly incubated with EphA2-Fc homodimers (gray, top) or after preincubation with 2 different doses of an anti-EFNA4 polyclonal Ab (0.10 or 0.20 μ g/10⁶ cells, middle and bottom, respectively; white, control anti-His FITC; black, control unstained cells). A representative experiment is shown (CLL no. 1). Values are mean fluorescence intensity (MFI; mean \pm SEM) from triplicates of the same sample. (D) TNF- α -activated HUVEC monolayers were cultured for 60 minutes with fluorescent preclustered EFNA4-Fc complexes (red). After cells fixation, slides were immunostained with anti-EphA2 or -EphA4 Abs (Alexa Fluor 488, green). Colocalization plots (bottom) show that EFNA4-Fc preferentially binds to EphA2 (ROI indicates region of interest). Leica TCS-SP2 AOBS confocal microscope; objective: 63 \times oil immersion, 1.40 NA.

images was performed with MetaMorph (Molecular Devices; see supplemental Methods).

All incubations with Abs (0.1 μ g/50 μ L in PBS/BSA) were done in a humidified chamber. Primary Abs were rabbit anti-EphA2, -EphA3, -EphA4 (Santa Cruz Biotechnology) and goat anti-EphA8 (R&D Systems) polyclonal Abs; and mouse anti-CD19, Alexa Fluor 647 anti-CD31, Alexa Fluor 488 anti-ICAM-1, and Alexa Fluor 647 anti-VCAM-1 mAbs (BD Biosciences). Preadsorbed species-specific secondary Abs (Invitrogen) were Alexa Fluor 546-coupled donkey anti-goat or anti-rabbit IgGs and Alexa Fluor 488-coupled donkey anti-mouse IgGs.

Immunofluorescence stainings of tissue sections

Eight-micrometer LN tissue sections (Leica cryocut at -24°C) were air-dried overnight, fixed for 10 minutes in acetone (Panreac), and air-dried for 1 hour. Prehydrated tissue sections (PBS/0.5% BSA) were then incubated with anti-EphA2, -EphA3, -EphA4, or -EphA8 and anti-CD19 primary Abs followed by Alexa Fluor 546- and Alexa Fluor 488-labeled secondary Abs. After washing, sections were incubated with purified mouse IgGs followed by Alexa Fluor 647-coupled anti-CD31 mAb.

Immunofluorescence staining of TEM assays and colocalization studies

TNF- α -activated HUVEC monolayers were grown onto fibronectin-coated (10 μ g/mL) 12-well glass chamber slides (Lab-Tek chamber slides; Nunc). For TEM assays, nonadherent B cells were removed by aspiration, slides fixed (CellFix solution; BD Biosciences), and incubated with anti-EphA2 and Alexa Fluor 488 anti-ICAM-1 primary Abs, then with Alexa Fluor 546-labeled secondary Ab.

For colocalization studies, HUVEC monolayers were cultured in the incubator (37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂) with fluorescent preclustered forms of either

EFNA4-Fc (0.5 μ g/10⁶ cells) or of anti-ICAM-1 mAb (0.1 μ g/10⁶ cells). Cultures were fixed (CellFix; BD Biosciences) at 15, 30, or 60 minutes. As appropriate, fluorescent EFNA4-Fc treatments were incubated with either anti-EphA2 or -EphA4 primary Abs followed by Alexa Fluor 546 secondary Ab or with Alexa Fluor 488 anti-ICAM-1, Alexa Fluor 647 anti-VCAM-1, and anti-EphA2 primary Abs followed by Alexa Fluor 546 secondary Ab. Anti-ICAM-1 treatments were stained with Alexa Fluor 647 anti-VCAM-1 and anti-EphA2 primary Ab followed by Alexa Fluor 546 secondary Ab.

Statistics

Data are mean values plus or minus SD or SEM from triplicate experiments. SPSS 15.0 for Windows was used for statistical analyses. Mean values were compared by 1- or 2-sample 2-tailed Student *t* test. Significance was recognized at *P* values less than .001, .005, or .05.

Results

The CD31⁺ vascular endothelia of CLL and normal LNs express the EphA2 receptor for EFNA4

As determined by flow cytometry, PB CLL cells show an increased expression of EFNA4 compared with normal B cells (MFI 30.56 \pm 15.31 and 8.04 \pm 0.23, respectively; Table 1), inversely correlating with clinical lymphadenopathy (MFI 21.11 \pm 7.99 and 41.60 \pm 14.66, *P* < .01, with and without lymphadenopathy, respectively; Table 1), in keeping with our previous results.¹⁵

We analyzed the expression of EphA receptors in vascular endothelial cells from the enlarged LNs of 3 patients with CLL. As

determined by flow cytometry, most ($98\% \pm 4.66\%$) $CD31^+CD5^-CD19^-$ cells from CLL LNs strongly bound EFNA4-Fc proteins compared with the other LN-cell subpopulations studied (Figure 1A). RT-PCR analyses of EphAs mRNA expression in isolated $CD31^+CD2^-CD5^-CD19^-CD13^-CD14^-$ LN cells (3 CLL lymphadenopathies, 2 reactive LN, and 2 otherwise-normal sentinel LN), showed a high expression of EphA2 and, to a lesser extent, of EphA3, EphA4, EphA5, and EphA8 mRNAs (Figure 1B). Immunofluorescence studies in LN tissue sections confirmed a preferential expression of EphA2 by the $CD31^+$ vascular endothelium (Figure 1C), including high endothelial venules (Figure 1D). By contrast, EphA3, EphA4, and EphA8 were rarely expressed by the $CD31^+$ vascular structures (Figure 1C). These results supported the thesis that EphA2-EFNA4 interactions could take place during TEM of CLL and normal B cells.

An altered TEM of CLL cells through HUVEC monolayers is mediated by EphA2-EFNA4 interactions

To ascertain a plausible role of EphA2-EFNA4 interaction in the TEM of CLL cells or normal B cells, we carried out in vitro transmigration assays with TNF- α -activated HUVEC monolayers, which strongly expressed EphA2 and bound EFNA4-Fc fusion protein (Figure 2A). CLL cells from 7 of the 13 different CLL patients studied (nos. 1, 3, 4, 5, 8, 10, and 13), differing in EFNA4 expression (Table 1), showed a poorer adhesion and TEM than normal B cells (Table 2). As determined by confocal microscopy analysis of similarly performed TEM experiments, endothelial EphA2 was largely concentrated in the cell contacts with B cells (Figure 2B), suggesting that EphA2-EFNA4 interactions can take place in the adhesion between both cell types.

To evaluate the role of this interaction in the TEM assays, HUVECs or B cells were pretreated separately with EFNA4-Fc or EphA2-Fc homodimers, respectively, thus blocking EphA2-EFNA4 interactions whereas cells binding of Eph/EFN-Fc homodimers could induce signaling into them (supplemental Figure 2).²⁵ As determined by flow cytometry, CLL cells from the 7 cases analyzed bound EphA2-Fc homodimers (Figure 2C), which was largely inhibited by preincubating cells with an anti-EFNA4 Ab (Figure 2C). Confocal microscopy studies showed that HUVECs bound EFNA4-Fc preferentially through EphA2 but not EphA4 (Figure 2D), another putative receptor for EFNA4 found in HUVECs (RT-PCR analyses not shown).

EphA2-Fc pretreatment of CLL cells further impaired TEM (Table 2), slightly improving that of normal B cells (Table 2). By contrast, EFNA4-Fc pretreatment of HUVECs reversed the impaired TEM of CLL cells (Table 2), as the number of them adhered increased (Table 2) in correlation with a significant decrease in the nonadhered cells (Table 2), which was accompanied, in 4 of the CLL samples (CLL nos. 4, 5, 8, and 10), by a significant increase in transmigrated cells (Table 2). These results suggested that EFNA4 signaling into the highly positive CLL cells can inhibit TEM, through modulating adhesion and/or transmigration, whereas EphA2 signaling into endothelia promotes this process.

CLL cells have an impaired adhesion to HUVECs that is related to EFNA4 expression

To evaluate whether the adhesion potential of CLL cells to HUVECs can be correlated with clinical-stage and EFNA4 expression, we measured the formation of conjugates between both cell types by flow cytometry (supplemental Figure 1). In control

Table 2. TEM of CLL cells and normal B cells through HUVEC monolayers and the effect of EphA2-Fc or EFNA4-Fc addition

Sample/fraction no.	Treatment, %		
	hFc control	EFNA4-Fc	EphA2-Fc
CLL-1			
F1	96.49 \pm 0.11	76.91 \pm 0.10*	99.21 \pm 0.03*
F2	3.35 \pm 0.05	22.94 \pm 0.09*	0.78 \pm 0.04*
F3	0.16 \pm 0.05	0.16 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01
CLL-3			
F1	94.66 \pm 0.91	80.73 \pm 1.46†	96.58 \pm 0.31
F2	3.72 \pm 0.38	17.10 \pm 1.20†	2.60 \pm 0.07
F3	1.63 \pm 0.53	2.17 \pm 0.25	0.82 \pm 0.24
CLL-4			
F1	96.47 \pm 0.25	73.35 \pm 0.15*	98.93 \pm 0.08†
F2	3.20 \pm 0.26	26.21 \pm 0.15*	1.06 \pm 0.08†
F3	0.32 \pm 0.01	0.45 \pm 0.00†	0.00 \pm 0.00*
CLL-5			
F1	94.47 \pm 0.08	65.80 \pm 0.26*	98.94 \pm 0.22†
F2	5.30 \pm 0.06	33.81 \pm 0.26*	1.06 \pm 0.23†
F3	0.24 \pm 0.02	0.40 \pm 0.01†	0.00 \pm 0.00†
CLL-8			
F1	82.62 \pm 2.13	62.32 \pm 1.54†	95.12 \pm 0.95†
F2	11.29 \pm 1.47	22.68 \pm 0.45†	3.11 \pm 0.64†
F3	6.10 \pm 0.66	15.00 \pm 1.09†	1.78 \pm 0.30†
CLL-10			
F1	75.49 \pm 0.42	48.35 \pm 0.85*	89.24 \pm 0.16*
F2	16.10 \pm 0.21	35.83 \pm 0.58*	4.32 \pm 0.02*
F3	8.41 \pm 0.21	15.82 \pm 0.27†	6.45 \pm 0.18†
CLL-13			
F1	90.83 \pm 0.12	63.23 \pm 0.16*	98.98 \pm 0.00*
F2	8.26 \pm 0.09	35.90 \pm 0.14*	1.01 \pm 0.01*
F3	0.91 \pm 0.03	0.88 \pm 0.02	0.02 \pm 0.01*
NBC-1			
F1	50.94 \pm 0.08	44.78 \pm 1.08†	51.73 \pm 0.37
F2	27.25 \pm 0.35	28.51 \pm 0.70	22.43 \pm 0.61†
F3	21.80 \pm 0.43	26.72 \pm 0.38†	25.85 \pm 0.23†
NBC-2			
F1	60.59 \pm 0.56	43.17 \pm 0.25*	55.62 \pm 0.54†
F2	26.45 \pm 0.61	40.90 \pm 0.15*	18.89 \pm 0.16†
F3	12.95 \pm 0.05	15.94 \pm 0.10*	25.50 \pm 0.70†

TEM assays were carried out by coculturing normal B cells or CLL cells with HUVEC monolayers during 2 hours, and nonadhered (F1), adhered (F2), or transmigration cells (F3) were counted by flow cytometry. The absolute number of cells recovered within each fraction (Fn) was normalized to the total number of them recovered (Fn/F1 + F2 + F3) and expressed as percentages (%). CLL/normal B cells or HUVECs were pretreated with saturating amounts of EphA2-Fc or EFNA4-Fc, respectively. Values are mean \pm SD from triplicates. Significant differences between treated and control hFc cultures were calculated by 1-sample, 2-tailed Student *t* test.

CLL indicates chronic lymphocytic leukemia; F, fraction; hFc, Fc fragment of human IgG immunoglobulin; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell; NBC, normal B cell; and TEM, transendothelial migration.

*Value of *P* < .001.

†Value of *P* < .005.

‡Value of *P* < .05.

conditions (hFc-only pretreated cells), CLL cells from the 13 patients examined (Table 1) showed a reduced adhesion to HUVECs compared with normal B cells (conjugate percentages at 60 minutes = 8.58 ± 3.76 and 27.27 ± 4.39 , respectively; Figure 3A). Among CLL cases, adhesion was significantly greater in advanced disease stages (11.99 ± 1.93 and 9.76 ± 3.40 , intermediate or high-risk stages, respectively) than in the low-risk ones (4.55 ± 1.96 ; Figure 3A) as well as in those cases having lymphadenopathy (11.94 ± 2.17 ; CLL nos. 5-11) than in those not having it (5.23 ± 1.90 ; CLL nos. 1-4, 12, and 13; *P* < .001), inversely correlating with EFNA4 expression (Figure 3B).

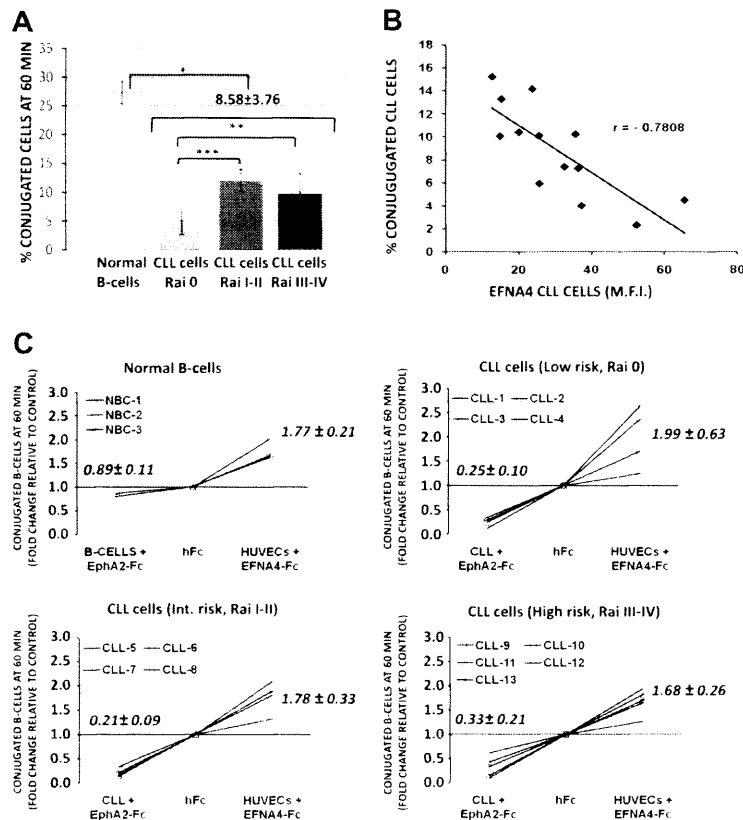


Figure 3. CLL cells show an impaired adhesion to HUVECs that can be correlated with EFNA4 expression and EphA2-EFNA4 interactions. (A) The percentage of CLL (nos. 1-13) or normal B cells (3 samples), adhered to HUVECs (conjugates) were analyzed by flow cytometry (supplemental Figure 1) after 60 minutes coculture of PKH26-labeled HUVECs with the CFSE-stained B cells. Data are mean \pm SD. (B) Percentage of conjugated CLL cells at 60 minutes relative to EFNA4 expression (MFI, Table 1; r , Pearson correlation coefficient, $P < .05$). (C) HUVECs or B cells (CLL/normal) were preincubated separately with saturating amounts of EFNA4-Fc or EphA2-Fc homodimers, respectively ($0.5 \mu\text{g}/10^6$ cells), then washed and cocultured for 60 minutes, as in panel A. The percentage of conjugates in the treated cocultures was expressed as x-fold change relative to control conditions (hFc; x-coordinate crosses y-coordinate at 1). Most treatments were significantly different from hFc controls ($P \leq .05$) except that of normal B cells plus EphA2-Fc (nonsignificant).

These results suggested a role for this molecule in the TEM of CLL cells. In support of this, EphA2-Fc and EFNA4-Fc treatments differentially affected the adhesion of CLL or normal B cells to HUVECs (Figure 3C). Although EphA2-Fc treatment significantly inhibited adhesion of CLL cells (up to 0.2 times relative to hFc conditions; Figure 3C), EFNA4-Fc pretreatment of HUVECs markedly increased it in both B-cell types (up to 2.6 times relative to hFc conditions in CLL no. 3; Figure 3C).

EFNA4 signaling into CLL cells results in a reduced adhesion to different substrates

Upon EphA2-Fc treatment of CLL cells from 7 different patients (CLL nos. 1, 3, 4, 5, 8, 10, and 13), no significant changes of expression were observed in several CAMs examined implicated in the TEM of lymphocytes, including CD62-L (L-selectin), CD11a (αL subunit of integrin LFA-1), CD18 (β2 -integrin), CD29 (β1 -integrin), or CD49d (α4 integrin, VLA-4), except for down-modulation in the CD44 antigen (Figure 4A).

Then, we evaluated whether EphA2-Fc-treated CLL cells modulate their adhesion to several of the ligands for the CAMs examined (Figure 4B). EphA2-Fc-treated CLL cells from the 7 patients showed a marked decrease in adhesion to most of the ECM components tested, specially FN, VN, and type I collagen (Figure 4B) but also to ICAM-1 and VCAM-1 (Figure 4B). By contrast, normal B cells did not significantly change their adhesion to these ligands after EphA2-Fc treatment (Figure 4B). These results suggest that EFNA4 signaling plays a cell-autonomous role in the adhesion properties of CLL cells to endothelium, largely inhibiting it, which can be linked to an impaired TEM potential.

EFNA4 signaling into CLL cells inhibits CCL19 chemotaxis

CLL cells express functional CCR7, CXCR4, and CXCR5 chemokine receptors, which could be implicated in their migration into LN.⁶⁻⁸ Thus, CLL TEM assays were performed in the presence of CCL19, CXCL12, or CXCL13 chemokine gradients and the effect of EphA2-Fc or EFNA4-Fc treatments was evaluated. In control cultures, CLL cells (CLL nos. 1, 3, 4, 5, 8, 10, and 13) showed a better TEM in response to CCL19 chemokine than to CXCL12 or CXCL13 (Figure 5A). EphA2-Fc-treated CLL cells transmigrated significantly less than untreated cells in response to all 3 chemokines (Figure 5A). By contrast, although EFNA4-Fc pretreatment of HUVECs significantly enhanced the CCL19 mediated TEM of CLL cells, it had a negative effect on that induced by CXCL12 or CXCL13 chemokines (Figure 5A).

In the absence of HUVEC monolayers, only the CCL19-mediated chemotaxis of CLL cells was significantly inhibited by EphA2-Fc treatment (Figure 5B), suggesting that EFNA4 modulates cell-autonomously the CCR7-mediated chemotaxis.

Normal B cells also showed a significantly increased CCL19-mediated TEM upon EFNA4-Fc treatment of HUVECs (Figure 5A) and, in the absence of endothelial cells, EphA2-Fc treatment slightly inhibited CCL19 chemotaxis (Figure 5B). No significant changes in the TEM or chemotaxis of normal B cells mediated by CXCL12 or CXCL13 chemokines were noted (not shown).

EphA2 clustering on HUVECs recruits ICAM-1 and VCAM-1

EFNA4-Fc-induced relocalization of EphA2 on HUVECs (Figure 2D) could be also associated with an ICAM-1 and VCAM-1 topologic redistribution, both implicated in the lymphocytes' TEM. EFNA4-Fc fluorescent spots formed on the cell surface of cultured HUVEC monolayers, migrated inside the cell, and concentrated

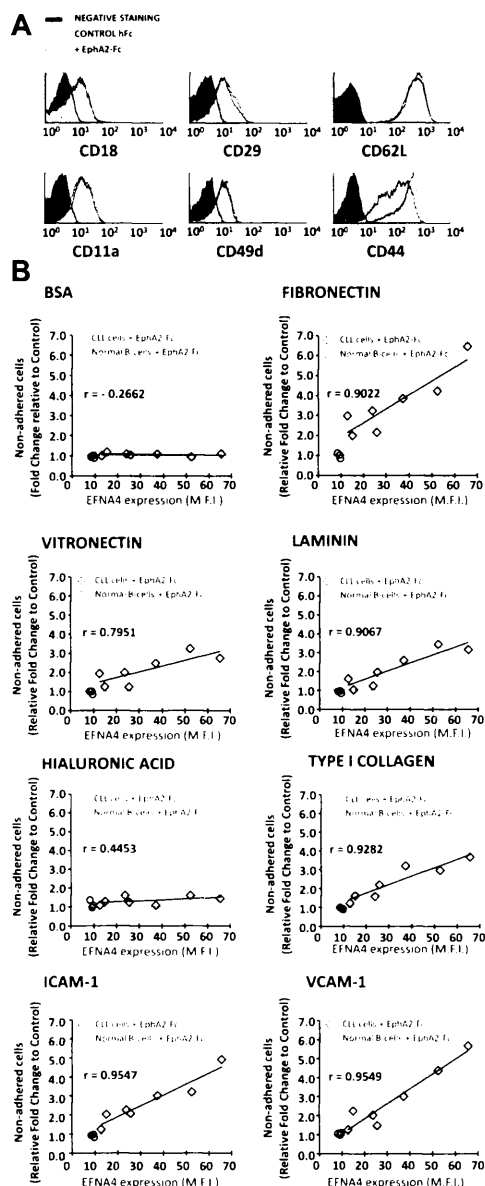


Figure 4. EFNA4 signaling of CLL cells down-modulates CD44 expression and decreases their adhesion to ECM molecules and ICAM-1 or VCAM-1 CAMs. (A) CLL cells were cultured for 1 hour in the absence (empty profiles) or presence (gray histograms) of saturating amounts ($0.5 \mu\text{g}/10^6$ cells) of soluble EphA2-Fc homodimers, then stained with Abs for flow cytometric analyses of CD18, CD29, CD62-L (top), CD11a, CD49d, or CD44 expressions (bottom; black histograms, background staining). A representative experiment is shown. (B) EphA2-Fc-incubated ($0.5 \mu\text{g}/10^6$ cells) or hFc-only-treated CLL cells (CLL nos. 1, 3, 4, 5, 8, 10, and 13), corresponding to different EFNA4 expression levels (Table 1), or normal B cells (3 samples), were cultured for 2 hours onto ECM- or CAM-coated culture wells ($3 \times 10^5/\text{well}$). Nonadhered cells were recovered and counted by the use of FACS. A measure of the effect of EphA2-Fc treatment on the cells adhesion was expressed as x-fold change relative to control hFc (number of nonadhered cells recovered in the treated cultures divided by those recovered in the corresponding hFc control ones) and represented against the corresponding EFNA4 expression (MFI) as determined by FACS (r , Pearson correlation coefficient, $P < .05$). Values are mean from triplicates.

perinuclearly in the basal side of HUVECs during a 60-minute culture (Figure 6A). The EphA2 clusterization induced by EFNA4-Fc was accompanied by an ICAM-1 and, to a lesser extent, VCAM-1 sequestration (Figure 6B). In contrast, cross-linking of ICAM-1 on HUVECs did not result in a similar colocalization with EphA2 (Figure 6B), suggesting that ICAM-1 can act independently of EphA2.

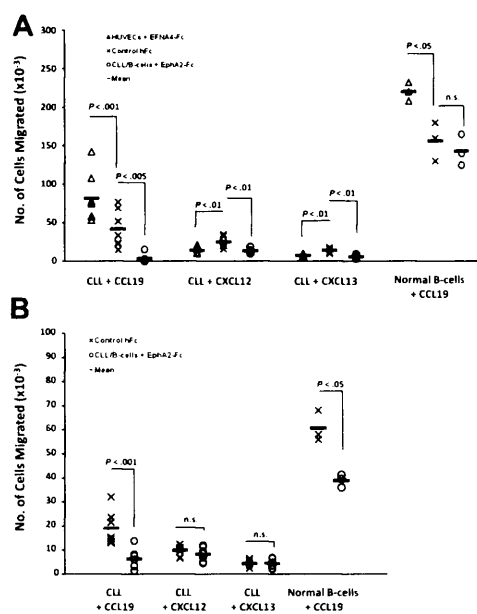


Figure 5. CCL19-, CXCL12-, or CXCL13-mediated TEM of CLL cells can be modulated by the EphA2-EFNA4 interaction. (A) CLL cells differing in EFNA4 expression (CLL nos. 1, 3, 4, 5, 8, 10, and 13) or normal B cells (3 samples; Table 1), were labeled with CFSE and added to the upper chamber of Transwell inserts ($5 \times 10^5/\text{well}$), which contained a HUVEC monolayer grown onto them and chemokines added to the lower chamber (CCL19, 500 ng/mL; CXCL12, 100 ng/mL; CXCL13, 1000 ng/mL). HUVECs or CLL/normal B cells were treated separately with EFNA4-Fc or EphA2-Fc homodimers ($0.5 \mu\text{g}/10^6$ cells, 30 minutes, 37°C), and chemotaxis was allowed to proceed for 2 hours. The number of cells migrated was determined by FACS. Mean values from triplicate experiments were compared with respect to control conditions (hFc-only-treated cells). The statistically significant differences are indicated by the P value. (B) Chemotaxis assays were performed as in panel A, in the absence of HUVECs and of the corresponding EFNA4-Fc treatment. Experiments were done in triplicate.

Discussion

In the present study, we demonstrate that expression of EFNA4 in B cells can be linked to the TEM process through a novel interaction with endothelial EphA2. Furthermore, in the case of CLL cells, the high expression of EFNA4 negatively mediates in the TEM, possibly regulating their extravasation potential.

A reduced extravasation capacity of CLL cells compared with that of normal B cells is supported by previous studies. Thus, ^{51}Cr labeling of CLL cells demonstrated that they leave the circulation less rapidly than normal B lymphocytes,¹¹ and [^3H]thymidine-labeled CLL cells were shown to survive in the circulation of a CLL patient for many weeks without any evidence of extravasation.¹⁰ In line with this, several in vitro studies^{12,26,27} have shown that the CLL cell has a reduced capacity to adhere to and/or transmigrate through endothelial-cell monolayers compared with normal B cells, whereas an increased adhesion to endothelium is observed in the more advanced stages.^{8,9,27} A recent study¹³ has also shown a severely impaired in vitro TEM capacity and in vivo homing of human PB CLL cells to murine peripheral LNs compared with normal B lymphocytes, which has been related to a defective integrin expression by CLL cells. We demonstrate that CLL cases with a low EFNA4 expression show a corresponding greater capacity to adhere to and transmigrate through HUVEC monolayers than those with greater expression, in correlation with disease stage and the presence or absence of lymphadenopathy in these patients, respectively.

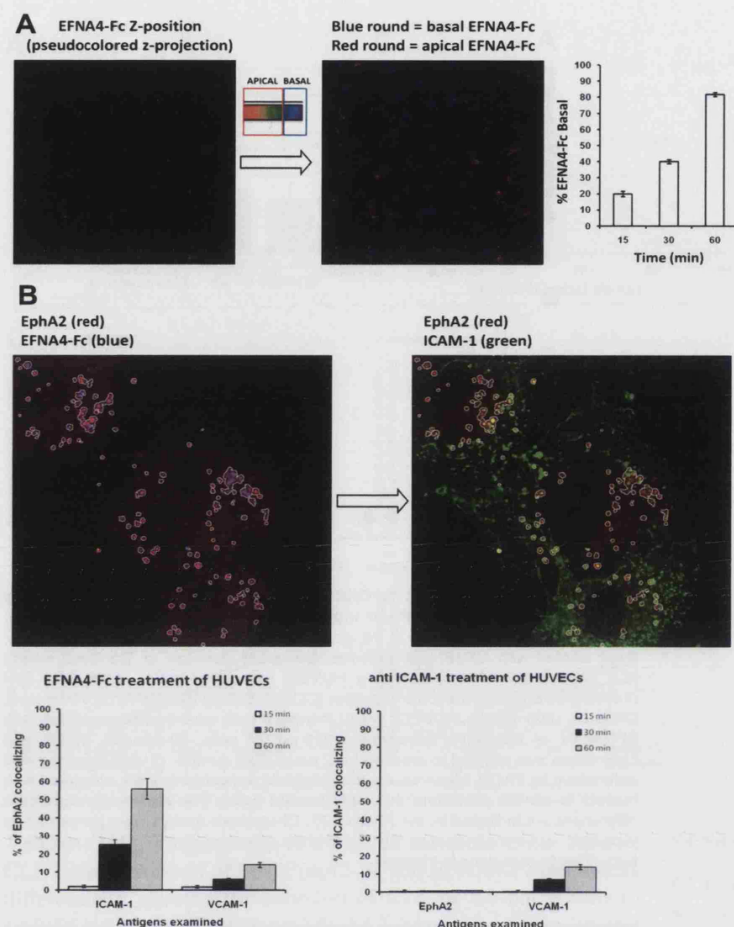


Figure 6. EphA2 colocalizes with ICAM-1 and VCAM-1 after in vitro EFNA4-Fc treatment of HUVECs. (A) HUVEC monolayers grown onto glass chamber slides and overnight activated with TNF- α (10 ng/mL) were incubated for 60 minutes with Alexa Fluor 405–EFNA4-Fc protein complexes. After cell fixation of cultures (at 15, 30, or 60 minutes), confocal images were acquired from the apical to the basal side of cells (0.1- μ m z-steps; 63 \times immersion-oil objective). Pseudocolor Z-series projections of image stacks were created (Leica LCS software) to determine the topologic distribution of EFNA4-Fc spots at each time point (left). At each time point, the number of basal and apical EFNA4-Fc spots was determined through image segmentation and analysis (MetaMorph version 7.1; right), according to the color threshold established in the pseudocolor scale bar (red regions, apical; blue regions, basal). Images are from a representative experiment after 60 minutes of culture. (B) HUVECs monolayers grown as in panel A were treated with either EFNA4-Fc protein complexes (preclustered with biotinylated anti-His Ab followed by streptavidin–Alexa Fluor 405) or cross-linking anti-ICAM-1 mAb (anti-ICAM-1 primary Ab preclustered with anti-mouse Alexa Fluor 488 Ab, green). Cultures were fixed after 15, 30, or 60 minutes and immunostained to analyze the colocalization of clustered EphA2 (anti-EphA2 plus Alexa Fluor 546 secondary Ab) with ICAM-1 (Alexa Fluor 488 Ab) or VCAM-1 (Alexa Fluor 633 Ab) or of EphA2 (Alexa Fluor 546) or VCAM-1 (Alexa Fluor 633 Ab) with ICAM-1, respectively. Z-series confocal images were acquired as in panel A. Fluorescent images are from a representative experiment of EFNA4-Fc treatment. Fluorescent blue-red spots, corresponding to EFNA4-Fc aggregated EphA2 (left), were identified as objects through color thresholding (MetaMorph software; white regions). The percentage of these regions containing ICAM-1 (green, right), was measured to determine EphA2 colocalization. The graphs represent the results from the corresponding treatments.

In other systems, the magnitude of Eph/EFN signaling is largely dictated by the extent of clusterization, leading to opposing responses such as cell adhesion or repulsion.^{16,18,28,29} Thus, the greater EFNA4 expression in CLL cells than in normal B cells seems to explain their different responses to similar EphA2 endothelial interactions. Accordingly, the EphA2-Fc treatment of CLL cells diminishes the proportion of cell conjugates established between them and HUVECs in an EFNA4 expression-dependent manner. EFNA4 reverse signaling has been reported to act through repulsive signals in other systems like inhibiting sensory neurite outgrowth within the developing mouse skin,³⁰ further suggesting that this molecule can lead to repulsive signals during cell-cell contacts in the TEM process.

EFNA4 signaling can modulate CLL-cell adhesion to endothelium through regulating other CAMs, as previously reported for other Eph/EFN members in different cell types,¹⁶ although the specific pathways of EFNAs reverse signaling are largely unknown. In fact, it down-modulated CD44 expression in CLL cells, a CAM implicated in the normal trafficking of lymphocytes but also in CLL, as well as impairing their adhesion to several integrin ligands, including ECM components like FN, VN, laminin, or endothelial CAMs, like ICAM-1 and VCAM-1, the magnitude of these effects being correlated with the levels of its expression.

Our results show that, in the absence of HUVECs, EFNA4 signaling can inhibit the CCL19-mediated chemotaxis of CLL cells

whereas CXCL12 or CXCL13 chemotaxis remained unaffected, supporting a major role in the CCR7-mediated migration. In the chemokine TEM assays, when EFNA4-Fc is added to cultures, the inhibitory effects of reverse signaling are not taking place, thus allowing adhesion but also CCL19-mediated migration. A cooperation between CCL19 and EphA2 forward signaling could also contribute to the increased TEM of CLL cells. In the case of CXCL12 and CXCL13, an increased adhesion caused by the absence of EFNA4 signaling is not sufficient for the TEM of CLL, suggesting that either EphA2 signaling is inhibitory for the TEM mediated by these chemokines and/or that they require a bidirectional EphA2-EFNA4 signaling. Further work will be necessary to clarify these hypotheses.

An essential property of Eph-EFN interaction is that it can result in bidirectional signaling into both the Eph- (forward signaling) and the EFN-expressing cells (reverse signaling).^{16-19,23,24} In our experimental conditions, the use of homodimeric Eph/EFN-Fc fusion proteins blocks bidirectional signaling while inducing Eph receptor clusterization and signaling.²⁵ This results in an imbalance in the bidirectional EphA2-EFNA4 signaling, similar to what is achieved in other systems when over-expressing Eph/EFN truncated forms lacking intracellular signaling domains,²⁹ but allows the cell- or non-cell-autonomous roles of the interacting Eph/EFN molecules to be analyzed. However, it remains to be determined

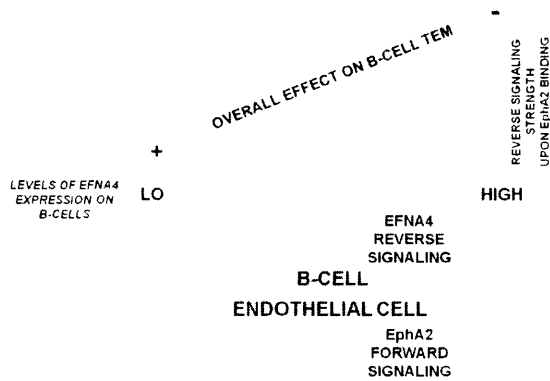


Figure 7. Summary of a hypothetical model of B cell TEM according to EphA2-EFNA4 interaction and its regulation by EFNA4 signaling strength. Low levels of EFNA4 expression, like those present in most of the normal PB B cells, allow TEM progression to proceed through generating EphA2 forward signals into endothelial cells that connect to the adhesion machinery (at least ICAM-1, VCAM-1 CAMs). By contrast, the greater the levels of EFNA4 expression in B cells, as determined in CLL B cells, led to inhibitory reverse signals that impair TEM.

whether a complete absence of EphA2-EFNA4 bidirectional signaling between lymphocytes and endothelium can be compensated or not by other Eph/EFNs expressed by both cell types, further clarifying the redundant or nonredundant role of these molecules in the studied TEM of lymphocytes.

CD31⁺ endothelial cells in human LNs mainly expressed EphA2 and rarely other members of the Eph family A such as EphA3, EphA4, and EphA8, which are preferentially expressed by nonendothelial cells scattered throughout the LN parenchyma, supporting the view that EFNA4-EphA2 interactions mediate the TEM of normal B cells. EFNA4-Fc treatment of HUVECs similarly affected CLL and normal B-cell TEM, increasing their adhesion and CCL19-dependent and -independent TEM, suggesting that EphA2 signaling into endothelium promotes TEM. One way of proceeding may be in concert with ICAM-1 and VCAM-1 molecules as the internalization of EphA2-EFNA4-Fc complexes in HUVECs was accompanied by ICAM-1 and VCAM-1 sequestration. Indirect evidence has suggested the involvement of EphA2 in leukocyte extravasation in other systems such as in thrombin-induced in vitro up-regulation of ICAM-1 in endothelial cells³¹ as well as the known up-regulation of endothelial EphA2 upon inflammatory stimuli.³²

In accordance with the role played by Eph receptors in regulating cell shape and movements through reorganizing the cytoskeleton,¹⁶⁻¹⁹ we propose that EphA2 could act through connecting the adhesive structure formed by ICAM-1 and VCAM-1 with the endothelial cytoskeleton that forms during TEM. The EphA2-EFNA4 interaction could work through regulating adhesion/detachment at discrete sites of contact between both cell types as in the "invasive" podosomes extended by lymphocytes to palpate the surface of the endothelium.³³ Detachment at sites of EphA2-EFNA4 interactions could occur through endocytosis of molecular complexes, a mechanism that has been shown to account for Eph/EFN signaling termination.^{16,17,28,34} Accordingly, when HUVECs were treated in culture with EFNA4-Fc, EphA2-EFNA4Fc complexes underwent rapid cell internalization. Furthermore, EFNA reverse signals can be modulated by cell-surface shedding of the ligand upon binding to EphA receptors through metalloproteases like Adam10/Kuzbanian, which cleaves EFNA2 from the cell sur-

face.³⁵ By this mechanism, Eph-receptor-bearing structures, such as growth cones, change their response to EFNA molecules from adhesion to repulsion.³⁵ Similarly, EphA2-EFNA4 interactions between endothelium and B cells could be actively formed and terminated to proceed with the TEM process in concert with other mechanisms, including those mediated by chemokines.

In summary, our results support the thesis that TEM of B cells can be mediated by EphA2-EFNA4 interactions and that it is largely dictated by the magnitude of EFNA4 reverse signaling into lymphocytes, leading to an overall repulsion when EFNA4 signaling strength overpasses a threshold, as it is the case in CLL. In contrast, the magnitude of EphA2 signaling into endothelial cells induced upon binding different levels of EFNA4 and its impact on B-cells TEM needs further evaluation (Figure 7).

Although other mechanisms might contribute to the development of clinical lymphadenopathy, such as the rate of cell proliferation/death within the infiltrates³⁶ and, presumably, the levels of lymphocyte egress/retention at the LN, interfering CLL cell extravasation might have therapeutic potential through preventing their migration into LN. Signaling through EFNA4 remarkably blocks TEM in vitro, suggesting that management of this molecule could potentially prevent CLL cell extravasation. Further work is necessary, however, to conclusively address these issues.

Acknowledgments

We thank patients for contributing to this research. We also thank Dr P. Cardas (Clinica Moncloa, Madrid) for anatomopathologic analysis of reactive LNs, Dr G. Sanz (H.G.U. Clínico San Carlos) for advice with CLL LN, Juan Ayuga (Blood Bank of H.G.U. G. Marañón, Madrid) for critical suggestions, Drs. Juan J. Muñoz and Angeles Vicente for critical suggestions and review of this manuscript, and Alfonso Cortés, Amalia Vázquez, and Carmen Hernández for their support with confocal microscopy and flow cytometry.

This work has been supported by grants from the Spanish Ministry of Health (FIS-PI50571; FIS PI080093) and the Spanish Ministry of Science (BFU 2004-03 132). E.T. was supported by the Spanish Ministry of Health (grants FIS-PIO50571 and FIS RD06/0010/0003).

Authorship

Contribution: L.M.A.-C. designed experiments; A.G.Z. contributed to the experimental design; E.M.T. and L.M.A.-C. performed the experiments; M.B. provided clinical cases, diagnosed CLL, and studied patients' characteristics; J.Z. provided lymph node biopsies and clinical data from these patients; E.M.T. and L.M.A.-C. analyzed data; E.M.T., M.B., A.G.Z., and L.M.A.-C. discussed data; E.M.T. contributed to writing the paper; L.M.A.-C. wrote the paper; M.B. and J.Z. contributed to the paper revision; and A.G.Z. revised the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Luis Miguel Alonso-Colmenar, Microscopy and Cytometry Research Centre, Faculty of Chemistry, Complutense University of Madrid, Ave Ciudad Universitaria, S/N, 28040 Madrid, Spain; e-mail: lmalonso@bio.ucm.es.

References

- Hamblin T. Chronic lymphocytic leukaemia: one disease or two? *Ann Hematol*. 2002;81(6):299-303.
- Moreno C, Montserrat E. New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev*. 2008;22(4):211-219.
- Patten PE, Buggins AG, Richards J, et al. CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood*. 2008;111(10):5173-5181.
- Soma LA, Craig FE, Swerdlow SH. The proliferation center microenvironment and prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Hum Pathol*. 2006;37(2):152-159.
- Ocaña E, Delgado-Perez L, Campos-Caro A, et al. The prognostic role of CXCR3 expression by chronic lymphocytic leukemia B cells. *Haematologica*. 2007;92(3):349-356.
- Bürkle A, Niedermeier M, Schmitt-Graff A, Wierda WG, Keating MJ, Burger JA. Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2007;110(9):3316-3325.
- López-Giral S, Quintana NE, Cabrerizo M, et al. Chemokine receptors that mediate B cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B-cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination. *J Leukoc Biol*. 2004;76(2):462-471.
- Till KJ, Lin K, Zuzel M, Cawley JC. The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. *Blood*. 2002;99(8):2977-2984.
- Vincent AM, Cawley JC, Burthorn J. Integrin function in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1996;87(11):4780-4788.
- Dörmer P, Thernl H, Lau B. Chronic lymphocytic leukemia: a proliferative or accumulative disorder? *Leuk Res*. 1983;7(1):1-10.
- Bazerbashi MB, Reeve J, Chanarin I. Studies in chronic lymphocytic leukaemia. The kinetics of 51Cr-labelled lymphocytes. *Scand J Haematol*. 1978;20(1):37-51.
- Chen JR, Gu BJ, Dao LP, Bradley CJ, Mulligan SP, Wiley JS. Transendothelial migration of lymphocytes in chronic lymphocytic leukaemia is impaired and involved down-regulation of both L-selectin and CD23. *Br J Haematol*. 1999;105(1):181-189.
- Hartmann TN, Grabovsky V, Wang W, et al. Circulating B-cell chronic lymphocytic leukemia cells display impaired migration to lymph nodes and bone marrow. *Cancer Res*. 2009;69(7):3121-3130.
- Redondo-Muñoz J, Ugarte-Berzal E, Garcia-Marco JA, et al. Alpha4beta1 integrin and 190-kDa CD44v constitute a cell surface docking complex for gelatinase BMMP-9 in chronic leukemia but not in normal B cells. *Blood*. 2008;112(1):169-178.
- Alonso-C LM, Trinidad EM, de Garcillan B, et al. Expression profile of Eph receptors and ephrin ligands in healthy human B lymphocytes and chronic lymphocytic leukemia B-cells. *Leuk Res*. 2009;33(3):395-406.
- Pasquale EB. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell*. 2008;133(1):38-52.
- Pasquale EB. Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(6):462-475.
- Poliakov A, Cotrina M, Wilkinson DG. Diverse roles of eph receptors and ephrins in the regulation of cell migration and tissue assembly. *Dev Cell*. 2004;7(4):465-480.
- Klein R. Eph/ephrin signaling in morphogenesis, neural development and plasticity. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16(5):580-589.
- Aasheim HC, Delabie J, Finne EF. Ephrin-A1 binding to CD4⁺ T lymphocytes stimulates migration and induces tyrosine phosphorylation of PYK2. *Blood*. 2005;105(7):2869-2876.
- Sharfe N, Freywald A, Toro A, Dadi H, Roifman C. Ephrin stimulation modulates T-cell chemotaxis. *Eur J Immunol*. 2002;32(12):3745-3755.
- Sharfe N, Nikolic M, Cimpean L, Van De Kratts A, Freywald A, Roifman CM. EphA and ephrin-A proteins regulate integrin-mediated T lymphocyte interactions. *Mol Immunol*. 2008;45(5):1208-1220.
- Himanen JP, Nikolov DB. Eph signaling: a structural view. *Trends Neurosci*. 2003;26(1):46-51.
- Cowan CA, Henkemeyer M. Ephrins in reverse, park and drive. *Trends Cell Biol*. 2002;12(7):339-346.
- Stein E, Lane AA, Cerretti DP, et al. Eph receptors discriminate specific ligand oligomers to determine alternative signaling complexes, attachment, and assembly responses. *Genes Dev*. 1998;12(5):667-678.
- Gu B, Dao LP, Wiley J. Impaired transendothelial migration of B-CLL lymphocytes: a defect linked to low L-selectin expression. *Leuk Lymphoma*. 2001;42(1-2):5-12, 2001.
- Stauder R, Hamader S, Fasching B, Kemmler G, Thaler J, Huber H. Adhesion to high endothelial venules: a model for dissemination mechanisms in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1993;82(1):262-267.
- Himanen JP, Saha N, Nikolov DB. Cell-cell signaling via Eph receptors and ephrins. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19(5):534-542.
- Davy A, Soriano P. Ephrin signaling in vivo: look both ways. *Dev Dyn*. 2005;232(1):1-10.
- Moss A, Alvares D, Meredith-Middleton J, et al. Ephrin-A4 inhibits sensory neurite outgrowth and is regulated by neonatal skin wounding. *Eur J Neurosci*. 2005;22(10):2413-2421.
- Chan B, Sukhatme VP. Receptor tyrosine kinase EphA2 mediates thrombin-induced upregulation of ICAM-1 in endothelial cells in vitro. *Thromb Res*. 2009;123(5):745-752.
- Ivanov AI, Romanovsky AA. Putative dual role of ephrin-Eph receptor interactions in inflammation. *IUBMB Life*. 2006;58(7):389-394.
- Carman CV, Sage PT, Sciuto TE, et al. Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity*. 2007;26(6):784-797.
- Himanen JP, Nikolov DB. Eph receptors and ephrins. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35(2):130-134.
- Hattori M, Osterfield M, Flanagan JG. Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science*. 2000;289(5483):1360-1365.
- Messmer BT, Messmer D, Allen SL, et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest*. 2005;115(3):755-764.

Información Suplementaria

Anexo VII

Primer pairs used for RT-PCR analyses

Primer pairs were as follows: EphA1 (FW-GCCACCATCTGTACCTGTGA, RV-CTGACACTCCATTTTGGGCT); EphA2 (FW-GAACAACCTGAAGCCCCTGAA; RV-ATGATGTTGTGGTGGCTGAA); EphA3 (FW-CCAGCAACATGGATTGTCAG; RV-CAAACCTGTCGAGGGAGGAAG); EphA4 (FW-TGACGCATCCTGCATTAAGA; RV-ATAGGAATCTTGCCACCCCT); EphA5 (FW-ATCCCAATCAAGCTGTCCAC; RV-GTGAACCTGCCCATCGTTTTT); EphA7 (FW-GACCAAGAAGGCGATGAAGA; RV-TGCATCTAGGGCTCCATTTT); EphA8 (FW-TCCCAGAGCCCCAGTTCTAT; RV-ATGTTGGGATGGTTCGAATTG); EphA10 (FW-CCAAGTGTGCCCTGACTACCTGTC; RV-GTTCAGCCAAAGAGATGCCTAGGCTCAC); β -actin (FW-AGAGATGGCCACGGCTGCTT; RV-ATTTGCGGTGGACGATGGAG).

Cell treatments with recombinant proteins

Recombinant EphA2-Fc or EFNA4-Fc proteins (R&D, Vitro, Spain) were homodimers consisting of two N-terminal extracellular binding domains of the corresponding molecule fused to poly-histidine (6xHis) C-terminal tagged Fc fragments of human IgG immunoglobulin.

Where indicated, HUVECs or B cells were incubated firstly with purified human IgG Fc fragments (hFc, 1.0 $\mu\text{g}/10^6$ cells) (Jackson Immuno-Research, Europe), then with saturating amounts of EFNA4-Fc or EphA2-Fc (0.5 $\mu\text{g}/10^6$ cells, as determined by flow cytometry titration experiments, 0.1–0.25–0.5 and 1.00 $\mu\text{g}/10^6$), respectively, and washed before culture. All incubation steps were conducted for 30 minutes in a humidified incubator (37°C, 5% CO₂).

Confocal microscopy

Fluorescent pre-clustered forms of EFNA4-Fc were obtained by incubating EFNA4-Fc with biotinylated anti-His Ab (R&D) and SAV labeled AlexaFluor-405 or AlexaFluor-488 (Invitrogen).

Hoechst 33342 (Invitrogen) was used for counterstaining cell nuclei. Slides were finally mounted with 0.14 mm optical grade glass cover-slips in mounting medium for fluorescence (ProLong-Gold, Invitrogen).

Image analysis

To visualize graphically the co-localization of EFNA4-Fc and EphA2 or EphA4 in the EFNA4-Fc treated HUVEC cultures, bi-parametric two-channel fluorescence plots were created (LCS software, Leica). Co-localization was evidenced within Regions of interest (ROI).

To measure the topological cell localization of EFNA4-Fc treatments in HUVECs cultures, pseudocolor projections of z-stacks were created (LCS software, Leica). Fluorescent spots were segmented as objects upon fluorescence intensity thresholding (Metamorph v7.1 software, Universal Imaging, USA) and the percentages of fluorescent spots located in a basal or apical position were determined according to a color threshold established in the pseudocolor scale (Metamorph v7.1).

Table S1. Clinical details of patients with CLL

Case no.	Age (y)	Sex (gender)	Stage (Rai mod.)	Lympha- denopathy	Hb (g/dL)	WBC ($\times 10^9/L$)	CD38 (%)	ZAP-70 (MFI)	Cytogenetics
CLL-1	65	M	LO	NO	12.3	128	21	10.23	Normal
CLL-2	75	F	LO	NO	14.2	201	1	6.63	13q-
CLL-3	83	M	LO	NO	11.6	65	5	8.23	ND
CLL-4	62	M	LO	NO	13.5	45	0	45.23	13q-
CLL-5	76	M	INT	YES	11.5	66	23	21.23	+12
CLL-6	54	F	INT	YES	13.2	32	15	36.23	13q-
CLL-7	78	F	INT	YES	11.21	121	1	8.65	13q-
CLL-8	89	M	INT	YES	14.5	96	0	49.23	13q-
CLL-9	59	M	HI	YES	9.32	85	32	6.60	Normal
CLL-10	66	M	HI	YES	8.9	55	3	9.63	13q-
CLL-11	71	M	HI	YES	9.1	206	6	26.69	12+
CLL-12	91	M	HI	NO	7.8	144	25	65.98	17p-
CLL-13	63	F	HI	NO	8.5	85	0	5.63	13q-

Hb indicates hemoglobin; WBC, white blood cell count; ND, non determined; MFI, mean fluorescence intensity. CD38 and ZAP-70 expressions were determined by flow cytometry.

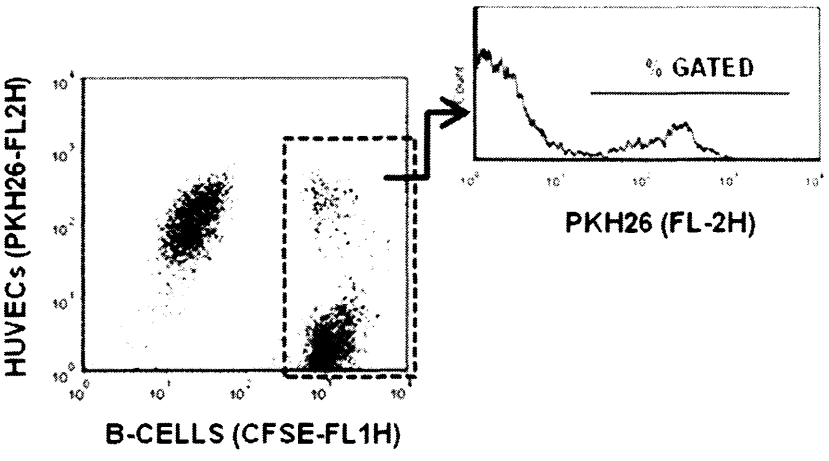
Figure S1

(A) Flow cytometric analyses of CLL/B-cell adhesion potential to HUVECs were done after co-culture of PKH26 labeled HUVECs with CFSE labeled B cells (B-cell conjugates). The whole CFSE labeled population was gated (discontinuous rectangular gate) and the percentage of PKH26 estimated in an FL2-H histogram (horizontal line). (B) Cell conjugates were done with CLL cells (CLL nos. 1–13) or normal B cells (normal B cells, NBC nos. 1–3) pre-incubated with hFc and analyzed as in panel A at different time points. CLL cells were from low (Rai 0, nos. 1–4), intermediate (Rai I–II, nos. 5–8) or high risk (Rai III–IV, nos. 9–13) patients. Data are mean±StdDev from triplicates. The values shown (mean±StdDev) are at 60 minutes.

Figure S2. Diagram illustrating EphA2-EFNA4 bidirectional signaling (arrows) that can take place upon interaction of HUVEC and B cells, in normal situations (I) and the hypothetical conditions reached in co-culture upon their pre-incubation with EFNA4Fc (II) or EphA2Fc (III) homodimers, respectively

Figure S1

A



B

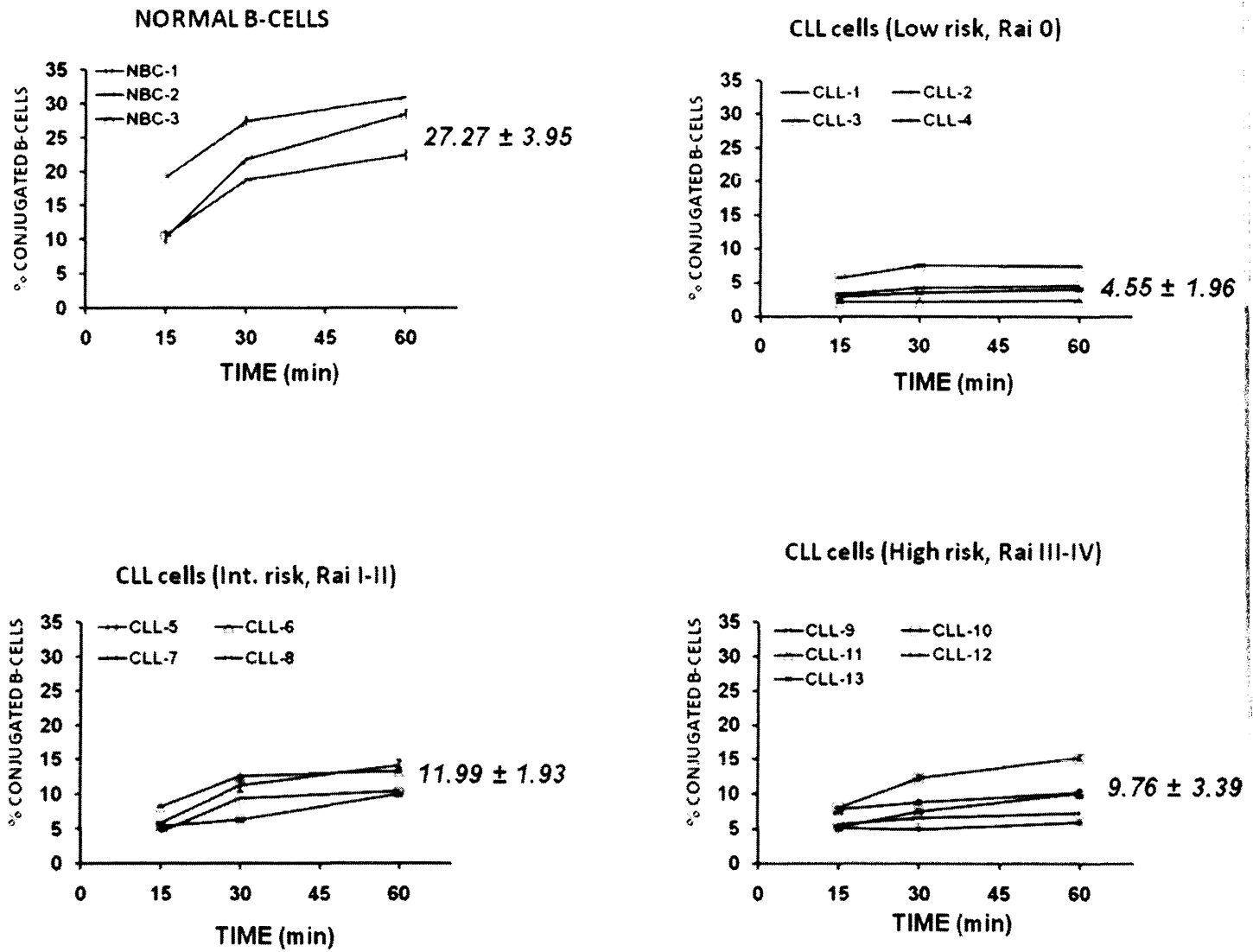
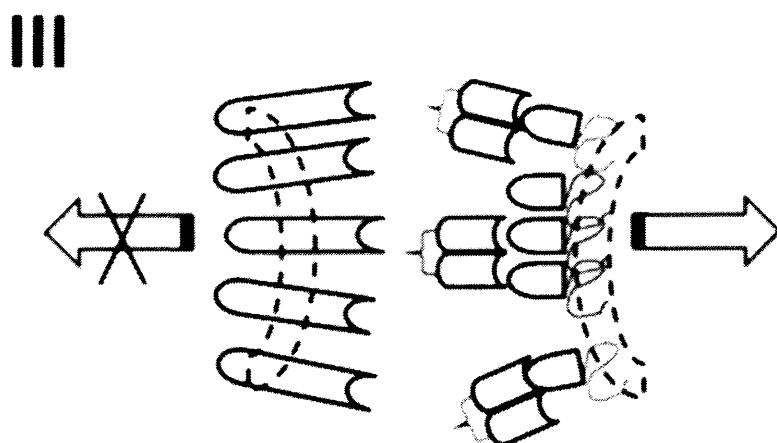
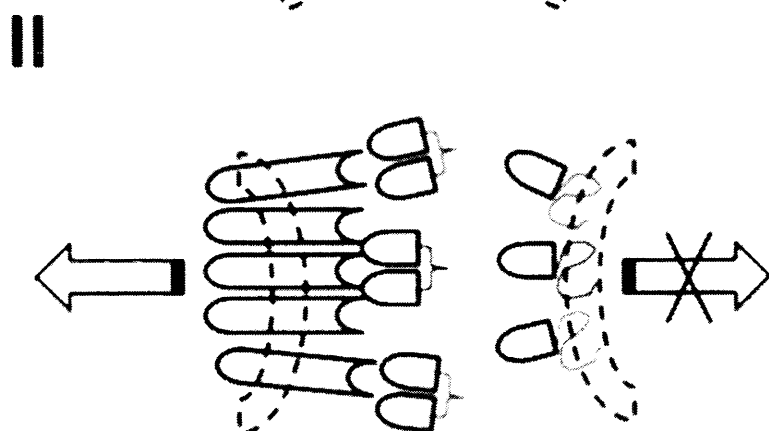
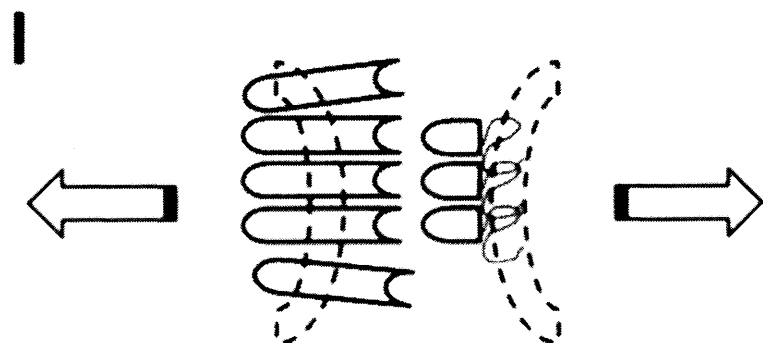


Figure S2

HUVEC B-CELL



EphA2

EFNA4

Native molecule

Native molecule

Recombinant Protein
(Dimers of EFN
binding domain)

Recombinant Protein
(Dimers of Eph
binding domain)

Anexo VIII

Eph-ephrin bidirectional signaling comes into the context of lymphocyte transendothelial migration

Eva M. Trinidad,¹ Agustín G. Zapata² and Luis M. Alonso-Colmenar^{1,*}

¹Microscopy and Cytometry Research Centre; and ²Department of Cell Biology; Faculty of Biology; Complutense University of Madrid; Madrid, Spain

A better knowledge on the molecular mechanisms that govern leukocyte trafficking is of the major relevance for the clinics. Both normal and pathologic extravasation of lymphocytes is a fine-tuned spatio-temporal event of migratory path-finding likely regulated by molecular guidance cues underlying cell movements in other systems. We have recently reported that members of the Eph family of receptor tyrosine kinases, namely EphA2 and one of its ligands, ephrin-A4 (EFNA4), can mediate in the traffic of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells and presumably of normal B-cells between the blood and the tissues. The importance of EphA2-EFNA4 interactions at the endothelium-lymphocyte interface during TEM could rely on their attractive/repulsive properties. In the present work, we expand on those results by including additional insights and new suggestions for future studies that remark the relevance of these molecules in overall cell adhesion dynamic events.

Introduction

Lymphocyte trafficking between blood and the tissues is an essential process to assure lymphoid homeostasis.¹⁻⁴ Lymphocytes migrate into (ingress) and out (egress) lymphoid tissues at the level of specialized vascular structures named high endothelial venules (HEV). They harbor the molecular machinery for accommodating, upon cross-talk with putative transmigrating lymphocytes, transendothelial migration processes.³ In many pathological conditions, selective leukocyte recruitment takes place at the level of

newly instructed endothelial venules as a consequence of context dependent signals including pro-inflammatory cytokines.^{3,5} A better knowledge of the molecular mechanisms orchestrating these processes is beneficial for the clinics including the development of new therapies for many human diseases.

Within the context of extravasation, lymphocytes and endothelial cells exchange bidirectional signals leading to mutually dependent alterations in their respective behaviors.⁶⁻⁸ A multistep cell adhesion cascade is currently recognized to be involved in the extravasation process that includes successive conditional lymphocyte-endothelial cell contacts: (1) tethering and "rolling"; (2) firm adhesion; (3) crawling and, (4) transmigration followed by tissue invasion.^{3,4,9,10} The first two steps, rolling and tethering, are the most relevant according to decisions-making, while the following steps are more concerned with the transmigration itself. The whole process is determined by the balance of extracellular signals derived from the involved tissue, mostly in the form of soluble molecules like chemoattractants and/or repellents (chemokines and others) and other factors like shear flow.^{3,11} As such, the intra/extravasation of lymphocytes is a complex event where migratory path-finding is regulated by numerous trafficking signals that selectively control the movement of distinct subsets of immune cells into and out specific tissues.

Substantial progress has been made in dissecting the molecular mechanisms that orchestrate the directed movement of leukocytes between the vasculature and the tissues^{7,11} and within the later ones,^{1,2}

Key words: Eph, ephrin, migration path-finding, trafficking, leukemia, endothelium, lymphocyte, CLL, extravasation, transendothelial migration

Abbreviations: CLL, chronic lymphocytic leukemia; Eph, erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma; EFN, ephrin (eph receptor interacting protein); TEM, transendothelial migration; HEV, high endothelial venule

Submitted: 12/18/09

Accepted: 02/22/10

Previously published online:
www.landesbioscience.com/journals/cell-adhesion/article/11586

*Correspondence to: Luis M. Alonso-Colmenar;
Email: lmalonso@bio.ucm.es

emphasizing the importance of existing attractive/repulsive signals underlying leukocyte migration.¹² Molecular mechanisms that act in a context dependent manner such as bidirectional guiding cues during development or in adult plastic systems can be relevant to leukocyte migration as well, like netrins, semaphorins, slit ligands and Eph/ephrins.

Eph/Ephrins

The Eph family of receptor tyrosine kinases and their ligands, ephrins (EFN), delivers attractive/repulsive signals that guide cell movements in a wide spectrum of processes during development including the axon growth cone during pathfinding, the boundary formation or the cell positioning during morphogenesis through restricting cell intermingling.¹³⁻¹⁶ An increasing body of knowledge is showing that Eph signaling also controls the architecture and homeostasis of different adult tissues under normal and pathological conditions,¹⁷⁻¹⁹ suggesting that common mechanisms of cells behavior can be modulated by them. They represent therefore putative new tools in cancer diagnosis and as potentially relevant molecular therapeutic targets.

They are classified into two families, EphA (nine members in humans) and EphB (six members), depending on the similarity within each group of the extracellular domain sequences and on their affinity for the membrane bound ligands, ephrin (EFN), either of type A (five members), which are glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored proteins to the cell membrane, or of type B (three members), which have a single transmembrane domain. Receptor/ligand interactions are promiscuous within each subclass and certain inter-class interactions also exist which can contribute to the fine-tuning of cell processes. Most Eph receptors contain an active tyrosine kinase domain while ephrins lack intrinsic catalytic activity but associate with tyrosine kinases and bind to several intracellular targets.²⁰ As such, an essential property of Eph-EFN interaction is that it can result in bidirectional signaling into both the Eph- (forward signaling) and the EFN-expressing cells (reverse

signaling)²¹⁻²³ and the occurrence of cell and non-cell autonomous roles.²⁰

An Impaired Transendothelial Migration Potential of Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Cells can be Linked to Ephrin-A4 Expression

We have recently described a novel molecular interaction that could mediate in the trafficking of CLL cells and, presumably, normal B-cells.²⁴ Through comparing lymph node tissue biopsies and peripheral blood B-cell preparations from CLL patients and control subjects, not suffering any kind of leukemia, as well as through several *in vitro* approaches, we showed that certain members of the Eph receptor family of tyrosine kinases, namely the EphA2 receptor and one of its ligands, the ephrin-A4 (EFNA4), could be involved in the B-cell trafficking through HEV. Overexpression of EFNA4 in CLL cells compared to normal B-cells can partially explain the observed reduced extravasation capacity of the former ones through repulsive signals. Besides, CLL cells from patients presenting clinical lymphadenopathy expressed lower levels of EFNA4 in correlation with a better *in vitro* adhesion and TEM, than those from patients who lack this clinical characteristic. Further experiments suggested that critical steps of the extravasation process, such as adhesion and/or transendothelial migration (TEM), can be modulated upon the interaction of EFNA4 expressed on lymphocyte cell surface with the EphA2 receptor found in the luminal side of CD31⁺ HEV from lymph nodes.

EphA2 Expression in the HEV of Human Lymph Nodes could be Related to Specific Leukocyte Recruitment and/or Pathologic Conditions

Our study demonstrated strong expression of EphA2 in the HEV from human lymph nodes, supporting the hypothesis that EphA2-EFNA4 interaction could mediate in the leukocyte trafficking between the blood and the tissues, at least in CLL.²⁴ EphA2 has been implicated in endothelial processes like angiogenesis

and tumor neovascularization^{25,26} through orchestrating cell-cell contacts as well as in the paracellular permeability of some vascular vessels²⁷ suggesting that it could be implicated in the dynamics of endothelial junctions during leukocyte passage through HEV. Besides, EphA2 has been related with the adhesion of leukocytes to endothelia in a thrombin-mediated inflammation *in vitro* system²⁸ and in other inflammatory conditions.²⁹ In mice, class A Eph/ephrins has also been related with T-cells trafficking.³⁰ We have recently realized that the high expression of EphA2 found in most of the HEV from CLL lymph nodes is limited to a "subset" of HEV within the control lymph nodes (Fig. 1), which we are currently characterizing. Thus, upregulated expression of EphA2 at certain HEV could be functionally related with specific leukocyte recruitment and/or pathologic conditions like in the CLL studied.

Disclosing EphA2-EFNA4 Bidirectional Signaling within the Molecular Context of Extravasation

As alluded to above, understanding how Eph/ephrin mediates their action is often complicated by the fact that both ligands and receptors are expressed in both cells involved in the interaction, which can lead to bi-directional signaling cascades. In order to evaluate *in vitro* the importance of each of the members in the performed assays,²⁴ HUVECs or B-cells were pre-incubated separately with soluble recombinant homodimers of the extracellular portion of human EFNA4 or EphA2, respectively, carrying a poly-His tag that allowed us further flow cytometry analysis of cells binding. By this way, we assured that EphA2-EFNA4 interactions are blocked in the co-cultures and that eventual signaling would only take place in the pre-incubated population. Both HUVEC and B-cells can express other Eph/ephrin members that bind to the corresponding recombinant homodimer such as EphA4, in the case of TNF- α activated HUVECs,²⁴ and several EFNA ligands, in the case of CLL or normal B-cells.³¹ Binding assays demonstrated that HUVECs bound EFNA4-Fc mainly through EphA2, as

determined by confocal microscopy, and that CLL cells bound EphA2-Fc mainly through EFNA4, as determined by flow cytometry.²⁴

Nevertheless, the co-expression of other members and/or counter receptor or ligands within single cells or cell subpopulations should be considered. Thus, the differential expression of some members within a given cell population, mainly B-cell subpopulations,³¹ could have side effects in the overall population response. Co-expression of different Eph/EFN members is commonly observed and some of them have been referred as a mechanism of regulation of Eph/EFNs signaling. These include receptor-ligand interactions in cis³²⁻³⁴ and the formation of Eph receptor heterocomplexes, including the participation of kinase defective Eph receptors like EphB6 and/or splice variants,¹⁶ which modulates the magnitude and type of signaling and the cell outcome. Thus, it would be interesting to carry out adhesion and TEM assays by co-culturing mixtures of EphA2-Fc treated and non-treated B-cells as well as different combinations of B-cell subpopulations according to other differentially co-expressed members.

The role played by EphA2-EFNA4 interactions in the TEM of CLL cells can also be related with chemokine-mediated chemotaxis.²⁴ CCR7 mediated chemotaxis of CLL cells can be directly modulated, in a cell autonomous way, by EFNA4 signaling while CXCR4 or CXCR5 chemotaxis were only affected in the TEM assays. It suggests that cell-cell contact dependent bidirectional EphA2-EFNA4 signals between B-cells and HUVECs differentially modulated chemokine driven migration. Transmigrating lymphocytes might recognize endothelial-presented chemokines in a cell contact dependent manner which is instrumental for integrin mediated lymphocyte adhesion and transendothelial migration.³⁵⁻³⁷ In the case of CXCR4 or CXCR5 mediated TEM, the CLL cell outcome is the same, i.e., no or less migration, whether HUVEC or CLL cells are pre-incubated with the corresponding recombinant molecule, suggesting that bidirectional Eph-EFN signals mediate the TEM induced by the chemokines. Another non-excluding possibility could be that the EphA2-EFNA4

mediated cell outcomes are also subjected to modulation by the endothelial-presented chemokines. Under shear flow conditions, leukocyte crawling onto endothelium is largely dictated by the endothelial-presented chemokines which coordinate spatio-temporal changes of the integrin mediated bonds,³⁸ a process where EphA2-EFNA4 interactions are likely to contribute. On this respect, evaluation of the EphA2-EFNA4 signaling in lymphocyte TEM under shear flow conditions is mandatory.

The wide spectrum of biological cell processes and developmental stages orchestrated by Eph/EFN signaling relies on cross-communication with multiple signaling pathways.^{16,39-41} Thus, they can regulate and be regulated by several other molecules including cell adhesion molecules, chemokine receptors or extracellular matrix components. On this regard, it remains to be further investigated the possible cross-talk between EphA2-EFNA4 signaling and that generated by other molecules involved in lymphocyte TEM including ectoenzymes,¹¹ cell adhesion

molecules and the endothelial-presented chemokines but also from other Eph/EFN members.

Contextualizing EphA2-EFNA4 Interactions as Possible Guiding Cues during TEM

EphA2 accumulates at inter-endothelial cell junctions and is evenly distributed on the luminal surface of TNF α activated HUVEC monolayers.²⁴ EphA2 aggregated on the surface of HUVECs upon incubation with EFNA4-Fc complexes and the EphA2-EFNA4Fc complexes were transcytosed toward a peri-nuclear basal location within 60 minutes.²⁴ This was accompanied by ICAM-1 and VCAM-1 sequestration into endothelial vesicles²⁴ reminiscent of the vesiculo-vacuolar organelles (VVO) or caveolae that have been related with the formation of a trans-cellular pore during leukocyte diapedesis through endothelium (trans-cellular route of migration).⁴²⁻⁴⁵

Besides, an increasing body of knowledge supports the notion that EphA2

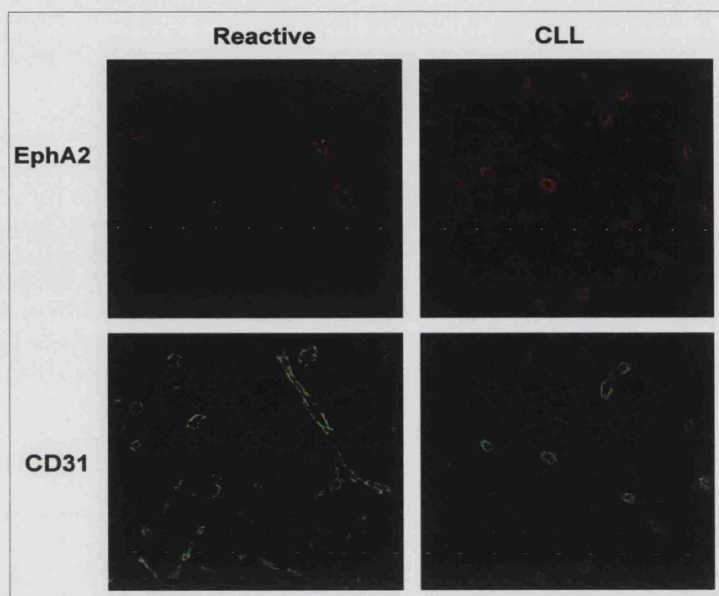


Figure 1. EphA2 is differentially expressed in the CD31⁺ vascular vessels of human lymph nodes. Eight μ m thick cryosections from human lymph node biopsies of either control subjects (reactive lymph node) (left) or CLL patients (right) were immunostained with a primary polyclonal antibody for human EphA2 followed by AlexaFluor-546 conjugated specie-specific secondary antibody (shown in red) and an AlexaFluor-488 conjugated anti human CD31 (shown in green). Representative experiments are shown. Fluorescence images were acquired with a confocal microscope (Leica TCS-SP2 AOB5; Objective: 20x multi-immersion, 1.20 NA).

expressed at endothelial and epithelial boundaries could contribute to the regulation of paracellular permeability at these tissue barriers through cross-talk with the junctional molecular machinery.^{27,46-48} In the context of paracellular TEM of leukocytes, repulsive signals delivered through EphA2-EFNA4 interactions could contribute to the weakening of endothelial cell adherens junctions in cooperation with the endothelial lateral border recycling compartment (LBRC)⁷ that surrounds migrating leukocyte. In support of this, our experiments showed that trans-migrating lymphocytes, especially normal B-cells, were surrounded by endothelial EphA2.

Thus, it is tentative to speculate that EphA2-EFNA4 interaction could participate in orchestrating the migratory path-finding during TEM through regulating the dynamic podosome-like protrusions extended by crawling lymphocytes and/or in the regulated formation of endothelial trans-cellular pores used for transcellular migration and/or the paracellular route.

The CLL Context

We have proposed a model of EFNA4 regulated extravasation of lymphocytes which is based on the realization that the defective adhesion and TEM of CLL cells can be linked to overexpression of this molecule.²⁴ Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a lymphoproliferative disorder characterized by peripheral lymphocytosis of CD5⁺ malignant B-cells with varying degrees of lymphoid tissue dissemination.⁴⁹⁻⁵² In accordance with our study,²⁴ several lines of evidence support the notion that CLL cells have an impaired migration into tissues which can be linked to an adhesion deficiency to HEV.⁵³⁻⁵⁸

CLL cells form proliferation centers or "pseudofollicles" within the infiltrated lymphoid tissues that can contribute to their survival and/or expansion^{59,60} and also to the enlargement of lymph nodes or clinical lymphadenopathy observed in some patients.⁶¹ A defective egress of the CLL cell population leading to their retention within tissues has also been proposed but not firmly demonstrated.⁵⁸ In such case, it is tentative to speculate that EFNA4 overexpression could be also

implicated in a hypothetical defective egress of the CLL cell population that remains to be investigated.

Remarkably, signaling through EFNA4 further impairs CLL TEM in vitro,²⁴ suggesting that management of this molecule could have a therapeutic potential through preventing their dissemination in the more severe cases. However, the challenge for the future is to assay its applicability through in vivo human-animal models and to clearly ascertain the specificity and/or side effects derived from EFNA4 signaling in CLL therapy.

Concluding Remarks

CLL could represent a "natural model" which has allowed the identification of EphA2-EFNA4 interaction as a putative new molecular mechanism which may govern lymphocyte trafficking in certain conditions. As indicated above, the differential expression of EphA2 in the HEV of non-CLL lymph nodes may be indicative of specific leukocyte recruitment and/or pathologic states which need further attention.

In conclusion, through orchestrating the cell adhesion dynamic events that take place during TEM, the EphA2-EFNA4 interaction could contribute to the migratory path-finding of lymphocytes through endothelial vessels.

Acknowledgements

This work has been supported by grants from the Spanish Ministry of Health (FIS-PI50571; FIS PI080093) and the Spanish Ministry of Science (BFU 2004-03132). E.T. was supported by the Spanish Ministry of Health (grants no. FIS-PI050571 and FIS RD06/0010/0003).

References

1. Germain RN, Bajenoff M, Castellino F, Chieppa M, Egen JG, Huang AY, et al. Making friends in out-of-the-way places: how cells of the immune system get together and how they conduct their business as revealed by intravital imaging. *Immunol Rev* 2008; 221:42-5.
2. Bajenoff M, Egen JG, Qi H, Huang AY, Castellino F, Germain RN. Highways, byways and breadcrumbs: directing lymphocyte traffic in the lymph node. *Trends Immunol* 2007; 28:346-52.
3. Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 2005; 6:1182-90.
4. Aurrand-Lions M, Johnson-Leger C, Imhof BA. The last molecular fortress in leukocyte trans-endothelial migration. *Nat Immunol* 2002; 3:116-8.

5. Rodrigo Mora J, Von Andrian UH. Specificity and plasticity of memory lymphocyte migration. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 308:83-116.
6. Witten ES. Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration. *Front Biosci* 2009; 14:2522-45.
7. Muller WA. Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes. *Circ Res* 2009; 105:223-30.
8. Alon R, Lusinskas FW. Crawling and INTEGRating apical cues. *Nat Immunol* 2004; 5:351-3.
9. Dunon D, Piali L, Imhof BA. To stick or not to stick: the new leukocyte homing paradigm. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8:714-23.
10. Imhof BA, Aurrand-Lions M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:432-44.
11. Salmi M, Jalkanen S. Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:760-71.
12. Huttenlocher A, Poznansky MC. Reverse leukocyte migration can be attractive or repulsive. *Trends Cell Biol* 2008; 18:298-306.
13. Battle E, Henderson JT, Beghtel H, van den Born MM, Sancho E, Huls G, et al. Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 2002; 111:251-63.
14. Henkemeyer M, Orioli D, Henderson JT, Saxton TM, Roder J, Pawson T, et al. Nuk controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system. *Cell* 1996; 86:35-46.
15. Lackmann M, Boyd AW. Eph, a protein family coming of age: more confusion, insight or complexity? *Sci Signal* 2008; 1:2.
16. Pasquale EB. Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6:462-75.
17. Merlos-Suarez A, Battle E. Eph-ephrin signalling in adult tissues and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2008.
18. Pasquale EB. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* 2008; 133:38-52.
19. Janes PW, Adikari S, Lackmann M. Eph/ephrin signalling and function in oncogenesis: lessons from embryonic development. *Curr Cancer Drug Targets* 2008; 8:473-9.
20. Davy A, Soriano P. Ephrin signaling in vivo: look both ways. *Dev Dyn* 2005; 232:1-10.
21. Holland SJ, Gale NW, Mbamalu G, Yancopoulos GD, Henkemeyer M, Pawson T. Bidirectional signalling through the EPH-family receptor Nuk and its transmembrane ligands. *Nature* 1996; 383:722-5.
22. Bruckner K, Pasquale EB, Klein R. Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors. *Science* 1997; 275:1640-3.
23. Davy A, Gale NW, Murray EW, Klinghoffer RA, Soriano P, Feuerstein C, et al. Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion. *Genes & development* 1999; 13:3125-35.
24. Trinidad EM, Ballesteros M, Zuloaga J, Zapata A, Alonso-Colmenar LM. An impaired transendothelial migration potential of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells can be linked to ephrin-A4 expression. *Blood* 2009; 114:5081-90.
25. Ogawa K, Pasqualini R, Lindberg RA, Kain R, Freeman AL, Pasquale EB. The ephrin-A1 ligand and its receptor, EphA2, are expressed during tumor neovascularization. *Oncogene* 2000; 19:6043-52.
26. Brantley DM, Cheng N, Thompson EJ, Lin Q, Brekken RA, Thorpe PE, et al. Soluble Eph A receptors inhibit tumor angiogenesis and progression in vivo. *Oncogene* 2002; 21:7011-26.
27. Larson J, Schomberg S, Schroeder W, Carpenter TC. Endothelial EphA receptor stimulation increases lung vascular permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 295:431-9.

28. Chan B, Sukhatme VP. Receptor tyrosine kinase EphA2 mediates thrombin-induced upregulation of ICAM-1 in endothelial cells in vitro. *Thromb Res* 2009; 123:745-52.
29. Ivanov AI, Romanovsky AA. Putative dual role of ephrin-Eph receptor interactions in inflammation. *IUBMB Life* 2006; 58:389-94.
30. Sharfe N, Nikolic M, Cimpean L, Van De Kratts A, Freywald A, Roifman CM. EphA and ephrin-A proteins regulate integrin-mediated T lymphocyte interactions. *Mol Immunol* 2008; 45:1208-20.
31. Alonso CL, Trinidad EM, de Garcillan B, Ballesteros M, Castellanos M, Cotillo I, et al. Expression profile of Eph receptors and ephrin ligands in healthy human B lymphocytes and chronic lymphocytic leukemia B-cells. *Leuk Res* 2009; 33:395-406.
32. Carvalho RF, Beutler M, Marler KJ, Knoll B, Becker-Barroso E, Heintzmann R, et al. Silencing of EphA3 through a cis interaction with ephrinA5. *Nat Neurosci* 2006; 9:322-30.
33. Yin Y, Yamashita Y, Noda H, Okafuji T, Go MJ, Tanaka H. EphA receptor tyrosine kinases interact with co-expressed ephrin-A ligands in cis. *Neurosci Res* 2004; 48:285-96.
34. Marquardt T, Shirasaki R, Ghosh S, Andrews SE, Carter N, Hunter T, et al. Coexpressed EphA receptors and ephrin-A ligands mediate opposing actions on growth cone navigation from distinct membrane domains. *Cell* 2005; 121:127-39.
35. Cinamon G, Grabovsky V, Winter E, Franitza S, Feigelson S, Shamri R, et al. Novel chemokine functions in lymphocyte migration through vascular endothelium under shear flow. *J Leukoc Biol* 2001; 69:860-6.
36. Grabovsky V, Feigelson S, Chen C, Bleijs DA, Peled A, Cinamon G, et al. Subsecond induction of alpha4 integrin clustering by immobilized chemokines stimulates leukocyte tethering and rolling on endothelial vascular cell adhesion molecule 1 under flow conditions. *J Exp Med* 2000; 192:495-506.
37. Piali L, Weber C, LaRosa G, Mackay CR, Springer TA, Clark-Lewis I, et al. The chemokine receptor CXCR3 mediates rapid and shear-resistant adhesion-induction of effector T lymphocytes by the chemokines IP10 and Mig. *Eur J Immunol* 1998; 28:961-72.
38. Shulman Z, Shinder V, Klein E, Grabovsky V, Yeger O, Geron E, et al. Lymphocyte crawling and transendothelial migration require chemokine triggering of high-affinity LFA-1 integrin. *Immunity* 2009; 30:384-96.
39. Arvanitis D, Davy A. Eph/ephrin signaling: networks. *Genes & development* 2008; 22:416-29.
40. Himanen JP, Saha N, Nikolov DB. Cell-cell signaling via Eph receptors and ephrins. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19:534-42.
41. Poliakov A, Cotrina M, Wilkinson DG. Diverse roles of eph receptors and ephrins in the regulation of cell migration and tissue assembly. *Dev Cell* 2004; 7:465-80.
42. De Bruyn PP, Cho Y, Michelson S. Endothelial attachment and plasmalemmal apposition in the transcellular movement of intravascular leukemic cells entering the myeloid parenchyma. *Am J Anat* 1989; 186:115-26.
43. Carman CV, Sage PT, Sciuto TE, de la Fuente MA, Geha RS, Ochs HD, et al. Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity* 2007; 26:784-97.
44. Nieminen M, Henttinen T, Merinen M, Marttila-Ichihara F, Eriksson JE, Jalkanen S. Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. *Nat Cell Biol* 2006; 8:156-62.
45. Millan J, Hewlett L, Glyn M, Toomre D, Clark P, Ridley AJ. Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nat Cell Biol* 2006; 8:113-23.
46. Miura K, Nam JM, Kojima C, Mochizuki N, Sabe H. EphA2 engages Grl1 to suppress Arf6 activity modulating epithelial cell-cell contacts. *Mol Biol Cell* 2009; 20:1949-59.
47. Hess AR, Seftor EA, Gruman LM, Kinch MS, Seftor RE, Hendrix MJ. VE-cadherin regulates EphA2 in aggressive melanoma cells through a novel signaling pathway: implications for vasculogenic mimicry. *Cancer Biol Ther* 2006; 5:228-33.
48. Zantek ND, Azimi M, Fedor-Chaiken M, Wang B, Brackenbury R, Kinch MS. E-cadherin regulates the function of the EphA2 receptor tyrosine kinase. *Cell Growth Differ* 1999; 10:629-38.
49. Ghia P, Caligaris-Cappio F. The origin of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 2006; 33:150-6.
50. Keating MJ, Chiorazzi N, Messmer B, Damle RN, Allen SL, Rai KR, et al. Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003; 153-75.
51. D'Arena G, Di Renzo N, Brugiattelli M, Vigliotti ML, Keating MJ. Biological and clinical heterogeneity of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2003; 44:223-8.
52. Hamblin T. Chronic lymphocytic leukaemia: one disease or two? *Ann Hematol* 2002; 81:299-303.
53. Stauder R, Hamader S, Fasching B, Kemmler G, Thaler J, Huber H. Adhesion to high endothelial venules: a model for dissemination mechanisms in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1993; 82:262-7.
54. Chen JR, Gu BJ, Dao LP, Bradley CJ, Mulligan SP, Wiley JS. Transendothelial migration of lymphocytes in chronic lymphocytic leukaemia is impaired and involved downregulation of both L-selectin and CD23. *Br J Haematol* 1999; 105:181-9.
55. Gu B, Dao LP, Wiley J. Impaired transendothelial migration of B-CLL lymphocytes: a defect linked to low L-selectin expression. *Leuk Lymphoma* 2001; 42:5-12.
56. Hartmann TN, Grabovsky V, Wang W, Desch P, Rubenzer G, Wollner S, et al. Circulating B-cell chronic lymphocytic leukemia cells display impaired migration to lymph nodes and bone marrow. *Cancer Res* 2009; 69:3121-30.
57. Bazerbashi MB, Reeve J, Chanarin I. Studies in chronic lymphocytic leukaemia. The kinetics of ⁵¹Cr-labelled lymphocytes. *Scand J Haematol* 1978; 20:37-51.
58. Dormer P, Theml H, Lau B. Chronic lymphocytic leukemia: a proliferative or accumulative disorder? *Leuk Res* 1983; 7:1-10.
59. Munk Pedersen I, Reed J. Microenvironmental interactions and survival of CLL B-cells. *Leuk Lymphoma* 2004; 45:2365-72.
60. Patten PE, Buggins AG, Richards J, Wotherspoon A, Salisbury J, Mufti GJ, et al. CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood* 2008; 111:5173-81.
61. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D, et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *The Journal of clinical investigation* 2005; 115:755-64.